



**ANDREIA PEREIRA  
COIMBRA**

**Estudo da citotoxicidade de grafeno prístino  
estabilizado com mononucleótido de flavina em  
pré-osteoblastos e osteoblastos**





**ANDREIA PEREIRA  
COIMBRA**

**Estudo da citotoxicidade de grafeno prístino  
estabilizado com mononucleótido de flavina em  
pré-osteoblastos e osteoblastos**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Mónica Cicuéndez Maroto, Investigadora de Pós-Doutoramento do TEMA e CICECO da Universidade de Aveiro.





Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã.



## **o júri**

presidente

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva; Professora Auxiliar  
Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Helena Cristina Correia de Oliveira  
Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia, CESAM & CICECO  
da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutora Mónica Cicuéndez Maroto  
Investigadora de Pós-Doutoramento do TEMA e CICECO da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Com este trabalho termina, mais uma etapa importante da minha vida, mais um desafio superado, incluindo muito esforço e dedicação.

Em primeiro lugar quero agradecer a Professora Virgília Silva e a Mónica Cicuéndez por me terem aceite como estagiária e sobretudo pela dedicação constante e grande ajuda que me dispensaram durante este trabalho.

Gostaria também de agradecer a professora Helena e as suas alunas pela ajuda constante e incansável, ao longo deste trabalho.

À minha colega de laboratório, Joana pelas palavras de apoio nos momentos mais difíceis, que sempre me ajudou ao longo do trabalho e sobre tudo pela boa disposição constante.

Às minhas queridas colegas, Carla, Ana, Sílvia, Margarida, Inês, e Cláudia pela ajuda, incentivo e amizade que me deram ao longo do meu percurso académico, mesmo estando longe.

Aos meus colegas de curso de Biologia molecular e celular, pelos bons momentos passados e pelas boas recordações que me proporcionaram.

À minha irmã Sara, pela força que me proporcionou mesmo estando muito longe, e também pela sua ajuda psicológica.

E por fim aos meus pais, pela ajuda financeira que me proporcionaram para poder realizar os meus estudos, mas sobretudo pelo voto de confiança que depositaram em mim.



## palavras-chave

Grafeno prístino, mononucleótido de flavina, citotoxicidade, pré-osteoblasto, osteoblasto.

## resumo

O grafeno é um nanomaterial que tem atraído o interesse da comunidade científica, desde da sua descoberta. Este interesse deve-se, principalmente, às propriedades físico-químicas e mecânicas únicas, que tornam o grafeno altamente atraente para aplicação em áreas como, eletrônica, ótica, biotecnologia e nanomedicina. A procura intensa e o desenvolvimento de diferentes aplicações para o grafeno conduziram aos chamados nanomateriais da família do grafeno (GFNs).

Neste trabalho, utilizaram-se dois tipos celulares pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2) para estudar a citotoxicidade do grafeno prístino estabilizado com um mononucleótido de flavina (FMN). Este nanomaterial foi sintetizado com diferentes tamanhos laterais: 100 - 200 nm (GP(S)) e 200 - 400 nm (GP(L)).

Os resultados obtidos demonstraram que as células cultivadas (MC3T3 e Saos-2) durante 24 h, na presença de diferentes concentrações de GP(S) (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ), apresentaram uma viabilidade diminuída e a taxa de proliferação celular foi inibida de uma forma dependente da concentração, em comparação com as células cultivadas na ausência de nanomaterial (controlo). Quando estas células foram expostas a GP(L) (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ), apresentaram uma viabilidade similar às células controlo. Relativamente à proliferação celular das células Saos-2 não é afetada, enquanto que a dos pré-osteoblastos diminui com o aumento da concentração de nanomaterial.

Através da citometria de fluxo, foi possível comprovar a internalização de nanomaterial e a produção de espécies reativas de oxigénio pelos tipos celular estudados, após 24 h de cultura na presença de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de nanomaterial. A internalização de GP(S) por ambos os tipos celulares é dependente da dose, sendo maior para a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Pelo contrário, no caso da exposição a GP(L), observa-se a internalização do nanomaterial, não sendo dependente da dose. A exposição durante 24 h a estes nanomateriais induz produção de espécies de oxigénio (ROS) em ambas as linhas celulares.

Com este trabalho podemos concluir que o grafeno prístino estabilizado com um mononucleótido de flavina (FMN), independentemente do tamanho, é citotóxico para pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2).





**keywords**

Pristine graphene, flavin mononucleotide, cytotoxicity, pre-osteoblasts, osteoblasts.

**abstract**

Graphene is a nanomaterial that has attracted the interest of the scientific community since its discovery. This interest is mainly due to the unique physical, chemical and mechanical properties that make graphene highly attractive for application in areas such as electronics, optics, biotechnology and nanomedicine. The intense demand and the development of different applications for graphene led to nanomaterials of the graphene family (GFNs). In this work, pre-osteoblasts (MC3T3-E1) and osteoblasts (Saos-2) were used to study the cytotoxicity of pristine graphene stabilized with a flavin mononucleotide (FMN). This nanomaterial was synthesized with different lateral sizes: 100 - 200 nm (GP(S)) and 200 - 400 nm (GP(L)). The results obtained demonstrated that MC3T3-E1 and Saos-2 viability in the presence of different concentrations of GP(S) (10 - 50 µg/ml) decreased, after 24 h of exposition; and the cell proliferation rate was inhibited in a concentration-dependent manner, in comparison with cells cultured in the absence of nanomaterial (control condition). By other hand, MC3T3-E1 and Saos-2 cells exposed to GP(L) (10 - 50 µg/ml) showed similar viability compared to control cells. Saos-2 proliferation was not affected, whereas that pre-osteoblasts proliferation decreased with increasing nanomaterial concentration. Through flow cytometry, it was possible to verify the nanomaterial incorporation and the reactive oxygen species production (ROS) by both cell types, after 24 h of culture in the presence of 10 and 50 µg /mL of nanomaterial. The GP(S) incorporation were dose-dependent, being higher at the 50 µg /mL concentration, while GP(L) nanomaterial was internalized in a non-dose-dependent manner. Exposure to these nanomaterials for 24 h induced ROS production in both cell lines. We conclude that, pristine graphene stabilized with a flavin mononucleotide (FMN) is cytotoxic to MC3T3-E1 pre-osteoblasts and Saos-2 osteoblasts, regardless of its lateral size.



# Índice

LISTA DE TABELAS .....	III
LISTA DE FIGURAS .....	V
ABREVIATURAS .....	VII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. NANOTECNOLOGIA .....	1
1.2. NANOMATERIAIS .....	2
1.2.1. <i>Nanomateriais de Carbono.</i> .....	4
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. LINHAS CELULARES.....	15
3.1.1. <i>MC3T3-E1</i> .....	15
3.1.2. <i>SAOS-2</i> .....	15
3.2. CULTURA CELULAR.....	16
3.3. MORFOLOGIA CELULAR.....	16
3.4. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	16
3.5. INTERNALIZAÇÃO CELULAR .....	17
3.6. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO .....	18
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. MORFOLOGIA CELULAR.....	20
4.2. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	21
4.3. INTERNALIZAÇÃO CELULAR .....	24
4.4. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO .....	28
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>37</b>



## **Lista de tabelas**

TABELA I. PRINCIPAIS ESTUDOS REPORTADOS NA LITERATURA COM NANOMATERIAIS DA GFNS. ....	9
---	---



## Lista de figuras

FIGURA 1. A MULTIDISCIPLINARIEDADE DA NANOTECNOLOGIA .....	1
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESCALA NANOMÉTRICA .....	3
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CLASSIFICAÇÃO DOS NANOMATERIAIS DE ACORDO COM AS SUAS DIMENSÕES. ....	4
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DOS ALÓTROPOS DE CARBONO. ....	5
FIGURA 5. FORMAS DE GRAFENO COMUMENTE USADAS. ....	7
FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DA FMN E ESQUEMA DA PREPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA DISPERSÃO DO GRAFENO ESTABILIZADO COM FMN. ....	19
FIGURA 7. MORFOLOGIA CELULAR DE PRÉ-OSTEOBLASTOS MC3T3-E1 E SAOS-2 .....	21
FIGURA 8. VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS MC3T3-E1 E SAOS-2 .....	22
FIGURA 9. PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS MC3T3-E1 E SAOS-2 .....	23
FIGURA 10. INTERNALIZAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS MC3T3-E1. ....	25
FIGURA 11. INTERNALIZAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS SAOS-2. ....	27
FIGURA 12. PRODUÇÃO DE ROS DAS CÉLULAS MC3T3-E1 E SAOS-2 .....	29





## Abreviaturas

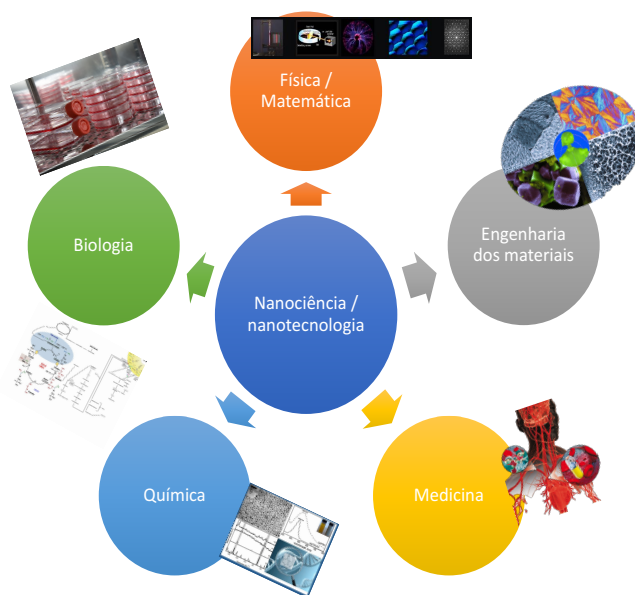
<b>CNT's</b>	Nanotubos de carbono
<b>0D</b>	Zero dimensional
<b>1D</b>	Monodimensional
<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>DCF H<sub>2</sub>-DA</b>	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
<b>DMEM</b>	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra- acético
<b>FBS</b>	Soro bovino fetal
<b>FCS</b>	Tamanho celular
<b>FMN</b>	Mononucleótido de Flavina
<b>ISO</b>	Organização internacional da standardização
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigénio
<b>rpm</b>	Revoluções por minuto
<b>rGO</b>	Oxido de grafeno reduzido
<b>SSC</b>	Dispersão lateral de luz
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	Meio essencial mínimo alfa
<b>GFNs</b>	Nanomateriais da família de grafeno
<b>GO</b>	Oxido de grafeno



# 1. Introdução

## 1.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia foi introduzida em 1959 por Richard Feynman, o primeiro prémio nobel da física, durante a sua palestra intitulada: “*There’s plenty of room at the bottom*” (Sanchez and sobolev, 2010; Disner *et al.*, 2016). Esta área científica é relativamente jovem e está em grande expansão, integrando disciplinas como a física, a química, a biologia, a medicina, a engenharia dos materiais e as ciências de uma forma geral (**Figura 1**) (Marques, 2014; Nikam and Mukesh, 2014).



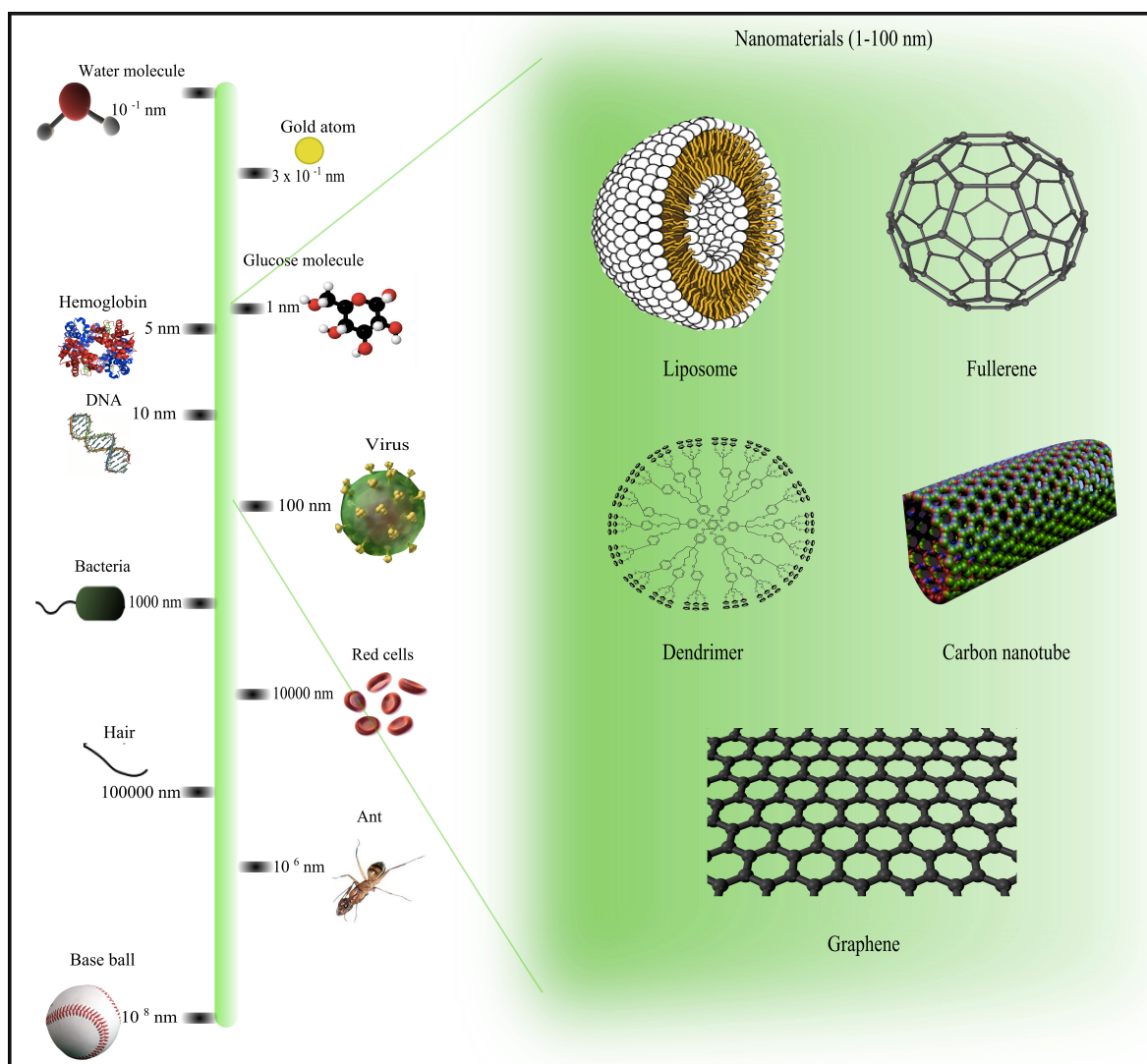
**Figura 1.** A multidisciplinariedade da nanotecnologia (Adaptado de Marques, 2014).

De uma forma geral, a nanotecnologia tem vindo a revolucionar o mundo científico e tecnológico, uma vez que permite compreender, controlar e reestruturar a matéria na ordem dos nanómetros, para criar materiais com propriedades e funções novas (Sanchez and Sobolev, 2010). Em 1974, a nanotecnologia foi definida por Norio Taniguchi, como sendo “uma técnica” que se baseia na separação, consolidação e deformação de elementos por um átomo ou por uma molécula (Drexler, 1992; Tarafdar *et al.*, 2013).

Seguidamente, em 1990, Don Eigler e Erhard Schweizer, conseguiram pela primeira vez observar ao nível da nanoescala, graças à evolução da microscopia (Eigler and Schweizer, 1990; Paula *et al.*, 2015). Foi necessário a criação de diversos sistemas à nanoescala (nanomateriais) com diferentes propriedades físico-químicas. O prefixo “nano” vem do grego “nanos”, que significa “muito pequeno” tendo sido este prefixo adotado em 1960, na conferência internacional de peso e medidas, correspondendo à bilionésima parte do metro ( $10^{-9}$  metro = 1 nanómetro [nm]) (Pasqualim *et al.*, 2010). A nanotecnologia ao longo dos anos tem apresentado uma incessante evolução, com um grande impacto académico e comercial (Bagheri *et al.*, 2015). A maior parte das aplicações são na área da medicina, designada nanomedicina, o que implica a utilização de sistemas à nanoescala (Sahoo *et al.*, 2007), com o objetivo de encontrar e fornecer ferramentas que permitam combater diversas doenças, como por exemplo o cancro. Neste sentido, a nanomedicina está em constante expansão com foco especial sobre as terapias anti-tumorais, como o sistema de transporte de drogas/genes, terapia fototérmica e o diagnóstico individual dos pacientes, ou seja, personalização das metodologias de diagnóstico existentes (Sahoo *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2011; Bagheri *et al.*, 2015; Venugopal and Ramakrishna, 2016).

## **1.2. Nanomateriais**

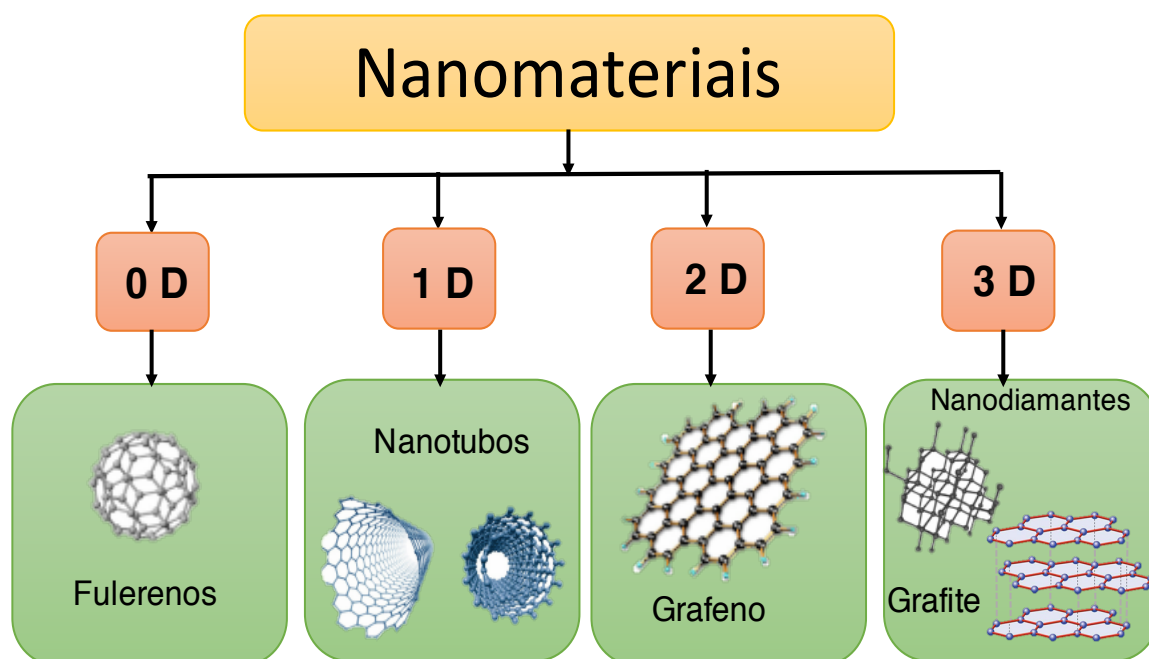
De acordo com a *Organização Internacional da Normalização* (ISO), os nanomateriais são definidos como materiais que apresentam pelo menos uma estrutura à nanoescala, com um tamanho que pode variar entre 1 e 100 nm (Kreyling, 2010; Dolez, 2015). Na natureza encontramos vários exemplos à nanoescala, como os vírus, proteínas, DNA, etc. (**Figura 2**) (Dolez, 2015).



**Figura 2.** Representação esquemática da escala nanométrica (adaptado de Panneerselvam and Choi, 2014).

Nos últimos anos, estes materiais produziram um grande interesse devido às suas inúmeras propriedades físicas, químicas e mecânicas únicas (Louro *et al.*, 2013; Daima, 2015; Tonelli *et al.*, 2016). As propriedades dos nanomateriais dependem essencialmente do seu tamanho reduzido, das suas modificações ao nível da superfície (funcionalização), do aumento da sua relação superfície/volume (área superficial) e da sua reatividade, o que lhes permite ter as mais variadas aplicações (Louro *et al.*; 2013; Daima, 2015). Os nanomateriais podem ser classificados de acordo com as suas dimensões (0D, 1D, 2D ou 3D), a sua composição química (metais, óxidos metálicos, semicondutores, polímeros e carbono), a sua origem (natural ou antropogénico), entre outros (Dolez, 2015; Gupta,

2015). A classificação mais usada é a que organiza os nanomateriais pelas suas dimensões, sendo elas: zero dimensional (0D) como nanopartículas; monodimensional (1D) como nanotubos e nanofios; bidimensional (2D) como nanofolhas de grafeno e tridimensional (3D) grafite e nanodiamantes (**Figura 3**) (Gupta, 2015; Ahmadi *et al.*, 2017).



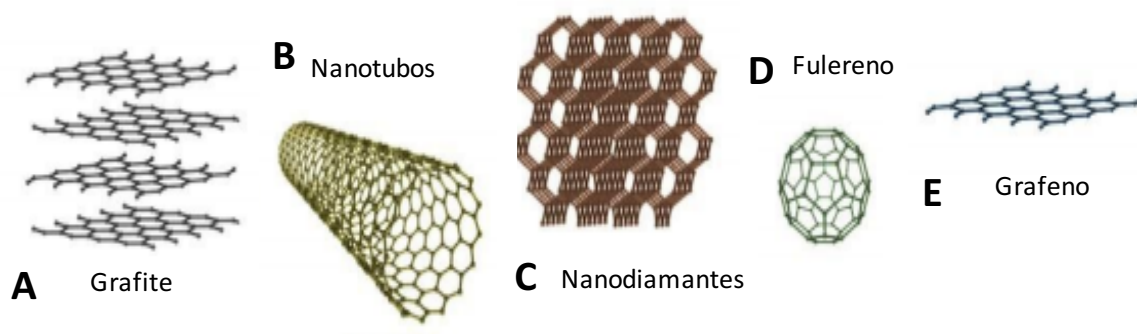
**Figura 3.** Representação esquemática da classificação dos nanomateriais de acordo com as suas dimensões. (Adaptado de Gupta, 2015)

Durante a última década, a comunidade científica tem dado uma maior atenção aos nanomateriais 1D e 2D, designando-os de “nanomateriais de próxima geração”. Os nanomateriais baseados em carbono, nomeadamente os nanotubos de carbono (1D) e o grafeno (2D) têm sido os alótropos de carbono mais estudados, devido às suas estruturas e propriedades únicas (Erol *et al.*, 2016).

### 1.2.1. Nanomateriais de Carbono

Hoje em dia o carbono, é apresentado como sendo um elemento importante, uma vez que se encontra na base de todos os seres vivos. Este elemento pode encontrar-se em duas formas distintas; o carbono orgânico e o carbono inorgânico (Loos, 2015).

O carbono, é um dos elementos mais versáteis presentes na tabela periódica, formando assim os mais diversificados alótropos de carbono (**Figura 4**).



**Figura 4.** Representação dos alótropos de carbono (adaptado de Zarbin, 2013).

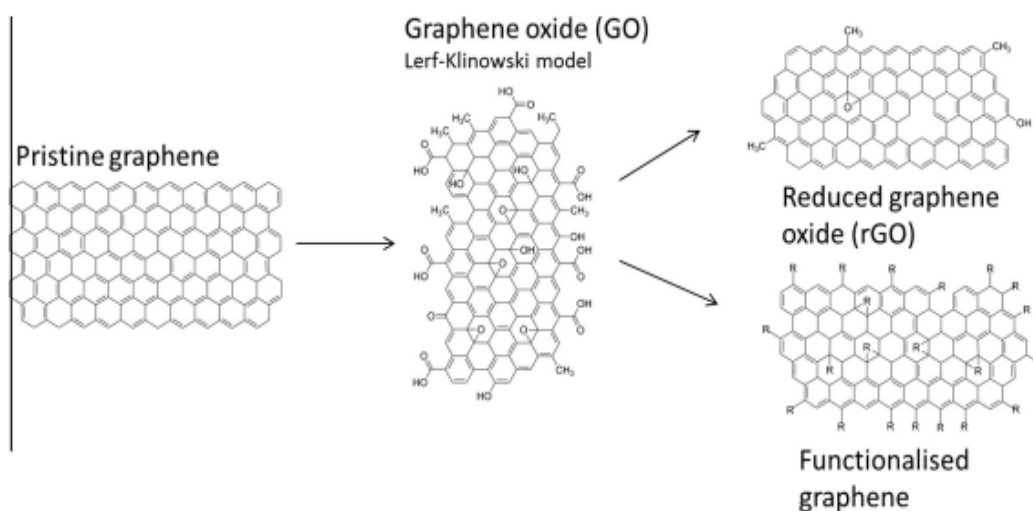
Da família de nanomateriais de carbono fazem parte a grafite, os nanotubos de carbono (CNT's), o nanodiamante, o fulereno e o grafeno, sendo os CNT's e o grafeno os mais representativos desta família (Zarbin, 2013).

A grafite (**Figura 4A**) é um sólido com uma estrutura lamelar, em que os átomos de carbono têm uma hibridização  $sp^2$  formando folhas bidimensionais com a aparência de uma rede hexagonal (Zarbin, 2013). A grafite tem sido usada com material de origem para a síntese de vários tipos de nanomateriais baseados em carbono incluindo os nanotubos de carbono, nanodiamantes, fulerenos e o grafeno (Cha *et al.*, 2013). Os CNT's (**Figura 4B**) podem apresentar uma parede única, onde uma só folha de grafeno é enrolada ou uma parede múltipla, onde se observa a presença de duas ou mais folhas de grafeno enroladas. Este alótropo exibe extraordinária mobilidade do transportador de carga, estabilidade eletroquímica e estiramento/flexibilidade mecânica (Zarbin, 2013; Zhai *et al.*, 2017). Relativamente ao nanodiamante (**Figura 4C**) apresenta uma geometria tetraédrica, com uma hibridização  $sp^2$  e  $sp^3$  dos átomos de carbono, onde a hibridização  $sp^2$  desempenha um papel importante na sua estabilidade. Este nanomaterial é considerado um sólido covalente com alta dureza, sendo usado na formação de filmes e revestimentos biocompatíveis e resistentes ao desgaste (Zarbin, 2013; Zhai *et al.*, 2017). Os fulerenos (**Figura 4D**) são uma forma molecular do carbono, com estrutura esférica, fortes ligações intramoleculares e baixas ligações intermoleculares. Este alótropo de carbono exibe excelente resistência ao desgaste, baixa fricção, alta condutividade e excelentes propriedades físicas e mecânicas (Hirsch, 2010; Zarbin, 2013; Zhai *et al.*, 2017). O grafeno (**Figura 4E**) é um cristal bidimensional, formado por ligações  $sp^2$  entre átomos de carbono, criando assim

uma rede hexagonal (Randvirr, 2014), sendo considerado uma forma alotrópica do carbono proveniente da grafite (Avouris *et al.*, 2012; Cordeiro, 2015). O grafeno é caracterizado pela sua alta condutividade elétrica, elevada elasticidade e por uma força mecânica inerente que lhe permite resistir a altas temperaturas, a produtos químicos e a solventes orgânicos (Mattevi *et al.*, 2012; Novoselov., 2012; Randvirr, 2014). As suas características fazem dele um candidato promissor a ser aplicado em nanomedicina concretamente em terapias anti-tumorais. Isto só será possível se for biocompatível. Para tal, o grafeno deve possuir propriedades adequadas à sua aplicação, nomeadamente no que diz respeito ao tamanho, estrutura, composição, fácil funcionalização, porosidade, entre outras (Yang *et al.*, 2015). Contudo, o grafeno apresenta baixa solubilidade, o que dificulta a sua aplicabilidade, devido à aglomeração causada pelas interações de Van Der Waals (Ayañ-Varela *et al.*, 2016; Dong and Qi, 2015). A funcionalização de nanomateriais baseados em carbono é vantajosa, pois aumenta a sua estabilização, solubilização, dispersão, entre outras (Amedea *et al.*, 2014), podendo afetar a sua citotoxicidade (Mccaillon *et al.*, 2016). Assim, os nanomateriais baseados em carbono são funcionalizados com polímeros, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG) (Matesanz *et al.*, 2013) ou com biomoléculas tais como péptidos e aminoácidos (Meng *et al.*, 2010; Motao *et al.*, 2012).

As procuras intensas de aplicações para o grafeno conduziram ao desenvolvimento de derivados de grafeno, os chamados nanomateriais da família do grafeno (GFNs). Sendo que os GFNs podem diferenciar-se na química da superfície (funcionalização), no número de camadas, na composição, na dimensão lateral, na pureza e na densidade (Sanchez *et al.*, 2012; Randvirr, 2014). Os GFNs mais usados hoje em dia pela comunidade científica são: o grafeno pristino, que consiste numa folha de grafeno sem nenhum grupo funcional em sua superfície (**Figura 5**) (Bianco, 2013); grafite ultrafinas; nano-esferas de grafeno que é uma camada aderida a um substrato ou uma camada única em suspensão (Bianco *et al.*, 2013); pontos de quantum de grafeno (Bianco *et al.*, 2013); óxido de grafeno (GO) (**Figura 5**) (Bianco *et al.*, 2013); óxido de grafeno reduzido (rGO) (**Figura 5**) sendo este material produzido pela redução do oxigénio no óxido de grafeno (GO) (Sanchez *et al.*, 2012).





**Figura 5.** Formas de grafeno comumente usadas (McCaillon *et al.*, 2016)

O químico Brodie sintetizou pela primeira vez óxido de grafite em 1859, tratando a grafite com uma mistura de cloreto de potássio e ácido nítrico (Bordie, 1859). Em 1957, Hummers e Offeman desenvolveram um método mais eficiente usando uma mistura de ácido sulfúrico, permanganato de potássio e nitrato de sódio. Este método é ainda hoje muito usado, embora com algumas modificações (Hummers and Offeman, 1958). O óxido de grafite é disperso na forma de folhas em meio básico, conhecidas como folhas de óxido de grafeno (Dreyer *et al.*, 2010). Este último, consiste em estruturas gráficas constituídas por uma rede cristalina funcionalizada com grupos epoxi, hidroxilo e carboxilo. O GO é geralmente obtido pela oxidação da grafite, que lhe confere características vantajosas tais como, uma maior hidrofiliabilidade, maior dispersibilidade e maior compatibilidade com os sistemas biológicos (Edwards and Coleman, 2013; Nanda *et al.*, 2015). No entanto, a variação da oxidação do GO, faz com que este varie consoante o tipo, a quantidade e a localização dos grupos funcionais. A introdução destes grupos funcionais resulta no aumento do espaço entre folhas de GO, que é responsável pela quebra das ligações de Van Der Waals, alterando a hibridação dos átomos de carbono oxidados, de  $sp^2$  (planar) para uma hibridação  $sp^3$  (tetraédrica) (Ciszewski and Mianowski, 2014). Pelo contrário, o grafeno prístino é um material hidrofóbico insolúvel na maioria dos solventes (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2013). O grafeno prístino é uma estrutura gráfica sem funcionalização da sua superfície e mantém as características únicas do grafeno. Este tipo de grafeno tem vindo a ser cada vez mais aplicado nas mais diversas áreas (Zhang *et al.*, 2010; Conroy *et al.*, 2014; Chatterjee *et al.*, 2015; Majeed *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, este

tipo de nanomaterial é insolúvel e necessita ser funcionalizado para evitar a formação de aglomerados (Ayañ-Varela *et al.*, 2016; Dong and Qi, 2015). Neste trabalho, utilizou-se grafeno pristino estabilizado com o mononucleótido de flavina (FMN), para a avaliação da sua citotoxicidade.

A **tabela I** evidencia alguns exemplos de trabalhos desenvolvidos com os nanomateriais da GFNs mais usados (GO, rGO, e grafeno pristino), demonstrando os respectivos efeitos causados em diferentes tipos celulares.

**Tabela I.** Principais estudos reportados na literatura com nanomateriais da GFNs.

Material	Funcionalização	Tamanho	Tipo celular	Condições do ensaio	Efeitos observados	Referências
GO	PEG	100 nm	Osteoblastos (Saos-2), Pré-osteoblastos (MC3T3-E1), Macrófagos (Raw-264.7)	75µg/ml 24,48 e 72h	alterações no ciclo celular, apoptose, stress oxidativo e uma diminuição de proliferação.	Matesanz <i>et al.</i> , 2013
GO		90-160 nm 300-430 nm 410-780 nm	Pulmonares (A549)	10-200µg/ml 24h	↑ ROS ↓ Viabilidade celular. Efeitos dependentes da dose e tamanho.	Chang <i>et al.</i> , 2011
GO		2 µm 350 nm	Hepatócitos (HepG2), Células endoteliais da veia umbilical (HUVEC), Adenocarcinoma da mama(MCF7), Hepatócitos (J774A.1)	0-200µg/ml 24 e 48h	Internalização celular é independente do tamanho.	Yue <i>et al.</i> , 2012
GO		100-600 nm	Neuroblastos (SH-SY5Y)	10-100µg/ml 24, 48, 72 e 96h	↓ Viabilidade, dependente da dose e do tempo.	Lv <i>et al.</i> , 2012

GO	PEG	100 nm	Osteoblastos (Saos-2), Hepatócitos (HepG2), Macrófagos (Raw-264.7)	2h e 48h	Internalização dependente do tipo celular.	Linares <i>et al.</i> , 2014
GO Grafeno-COOH		100 nm-1 $\mu\text{m}$	Hepatócitos (HepG2)	1-16 $\mu\text{g/ml}$ 24h	$\uparrow$ ROS	Lammel <i>et al.</i> , 2013
GO Nanotubos de grafeno-OH		100 nm 1000-2000 nm	Hepatócitos (HepG2)	1 $\mu\text{g/ml}$ 12-48h	$\uparrow$ ROS	Yuan <i>et al.</i> , 2012
GO e rGO		0,4 $\mu\text{m}$ -0,8 $\mu\text{m}$	Células endoteliais da veia umbilical (HUVEC)	1-10 $\mu\text{g/ml}$ 24 e 48h	$\uparrow$ ROS Citotoxicidade depende da dose, do tamanho e do estado de oxidação.	Das <i>et al.</i> , 2013
GO e rGO		100 nm-5 $\mu\text{m}$	Pulmonares (A549), Macrófagos (Raw-264.7)	0,0125-12,5 $\mu\text{g/cm}^2$	A citotoxicidade depende da dose. Internalização por fagoendocitose.	Horváth <i>et al.</i> , 2013
GO rGO Grafeno pristino(GP)			Pulmonares (A549), Hepatócitos (HepG2)	0,1-5 $\mu\text{g/ml}$ 4-72h	$\downarrow$ Viabilidade celular $\uparrow$ ROS	Conroy <i>et al.</i> , 2014
GO Grafeno pristino(GP)			Neuronais (PC12)	5,50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ 2-24h	$\downarrow$ Viabilidade, dependente da dose e do grau de oxigenação.	Majeed <i>et al.</i> , 2017

GO Grafeno pristino(GP)	- -COOH -NH <sub>2</sub>	300-800 nm	Epitélio brônquico (Beas 2B)	5-150µg/ml 4-72h	↓ Viabilidade dependente da dose, do tipo de nanomaterial, da funcionalização, do numero de camadas e do tempo de exposição.	Chatterjee <i>et al.</i> , 2015
Grafeno pristino(GP)		500-1000 nm	Macrófagos (Raw-264.7)	0-100µg/ml 24 e 48h	↑ ROS, o que resulta na apoptose.	Li <i>et al.</i> , 2012
Grafeno fluorado			Pulmonares (A549)	0-400µg/ml 24h	A citotoxicidade depende da dose e da composição.	Teo <i>et al.</i> , 2015
Grafeno, pristino(GP)		3-5 nm	Neuronais (PC12)	0,01-100µg/ml 24h	efeito citotóxico dependente da dose e da forma.	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Grafeno pristino(GP) Grafeno -COOH		Espessura: 0,8 nm	Renais (Vero)	0-300µg/ml 24h	↑ ROS ↓ Viabilidade celular, dependente da dose. (Com GP)	Sasidharan <i>et al.</i> , 2011
Grafeno pristino Grafeno -COOH		Espessura: 0,4 nm	Macrófagos (Raw-264.7)	0-75µg/ml 24-48h	↓ Viabilidade com GP. ↑ ROS dependente da funcionalização.	Sasidharan <i>et al.</i> , 2012
Grafeno pristino(GP) Nanotubos de grafeno		50-200 nm	Fibroblastos (L-929)	0,5-500µg/ml 24h	↑ ROS dependente da dose e do tempo	Lee <i>et al.</i> , 2012



## 2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade do grafeno pristino estabilizado com mononucleótido de flavina (FMN) em duas linhas celulares diferentes, pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2). Estes nanomateriais foram sintetizados e caracterizados pelo grupo que pertence ao *Instituto Nacional del Carbón* (INCAR)-CSIC, localizado em Oviedo, Espanha.

Para o efeito, foi avaliado o impacto destes nanomateriais em:

1. Viabilidade e proliferação celular;
2. Internalização celular;
3. Morfologia celular;
4. Produção de espécies reativas de oxigénio.





### **3. Métodos**

#### **3.1. Linhas celulares**

No âmbito deste trabalho, foram utilizadas duas linhagens celulares, MC3T3-E1 e SAOS-2. Ambas as linhas celulares (Saos-2 e MC3T3-E1) foram obtidas a partir da "American Type Culture Collection" (ATCC® HTB-85™, Rockville, Md., USA) e da "European Collection of Cell Culture" (Catalogue No: 99072810), respectivamente.

##### **3.1.1. MC3T3-E1**

As células MC3T3-E1 são pré-osteoblastos ou osteoblastos imaturos, com a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e/ou osteócitos. Esta linhagem celular de pré-osteoblastos é derivada de osso da calvaria de ratos. Estas células possuem uma morfologia típica de fibroblastos, crescendo em monocamada aderente e são capazes de diferenciar-se em osteoblastos e osteócitos e são capazes de secretar colagénio (Quing *et al.*, 2017).

As células MC3T3-E1 são um modelo celular usualmente utilizado em ensaios *in vitro* para avaliar a sua capacidade de diferenciação e a capacidade de formação de matriz extracelular, mineralização óssea (Wang *et al.*, 1999; Quing *et al.*, 2017).

##### **3.1.2. SAOS-2**

As células SAOS-2 são uma linha celular obtida a partir de osteoblastos humanos derivados de um osteossarcoma primário (Lu *et al.*, 2015). Estas células crescem em monocamada aderente e possuem uma morfologia epitelial. O seu fenótipo é caracterizado pela expressão de colagénio e fosfatase alcalina e têm propriedades de osteoblastos maduros com capacidade para produzir matriz de mineralização [Rodan *et al.*, 1987; Strzelecka-Kiliszek *et al.*, 2017].

### **3.2. Cultura celular**

Os osteoblastos (SAOS-2) e os pré-osteoblastos (MC3T3-E1), foram mantidos em meio DMEM (SIGMA-aldrich) e  $\alpha$ -MEM (SIGMA-aldrich), respetivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% de solução de penicilina/estreptomicina (BioWhittaker EUROPE) e 0,5% de L-glutamina (SIGMA-aldrich), a 37°C e numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. para obtenção das células em suspensão, a monocamada formada foi lavada com tampão fosfato (PBS) e tripsinizada com 0,25% de tripsina-EDTA (Biochrom).

### **3.3. Morfologia celular**

A avaliação morfológica dos osteoblastos (Saos-2) e os pré-osteoblastos (MC3T3-E1), foram semeados com uma densidade de 100.000 células/mL em placas de cultura de 6 poços e incubadas 24 h, a 37°C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 24 h o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, ao qual foram previamente adicionados os nanomateriais GP(L) e GP(S) nas duas concentrações estudadas (10 e 50 µg/ml) previamente dispersados por ultrassons. As células foram incubadas durante mais 24 h nas mesmas condições. Após esta exposição, a monocamada celular foi lavada com PBS e observada num microscópio ótico invertido (ECLIPSE TS 100, Nikon; DIGITAL SIGHT DS-2Mv).

### **3.4. Viabilidade e proliferação celular**

Pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2) foram semeadas com uma densidade celular de 100.000 células/mL em placas de cultura de 12 poços, em meio suplementado como descrito anteriormente e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas, até à formação da monocamada celular.

Após 24 h o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, ao qual foram previamente adicionados os nanomateriais nas diferentes concentrações estudadas (10 - 50 µg/ml), previamente dispersados por ultrassons. Todos os ensaios incluem células na

ausência de nanomateriais (células controlo). As células foram expostas aos nanomateriais durante 24 h.

O teste do azul de tripano foi utilizado para avaliar a viabilidade e proliferação celular. Este corante é internalizado pelas células cuja membrana esteja deteriorada ou células mortas, o que permite a sua observação e contagem ao microscópio ótico, usando uma câmara de Neubauer (Piccinini *et al.*, 2017).

### **3.5. Internalização celular**

Para avaliar a internalização celular dos diferentes nanomateriais em estudo, os pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e os osteoblastos (Saos-2), foram semeados com uma densidade de 100.000 células/mL, em placas de cultura de 24 poços e incubadas nas mesmas condições previamente descritas.

Após 24 h o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, ao qual foram previamente adicionados os nanomateriais nas duas concentrações estudadas (10 e 50 µg/ml), previamente dispersados por ultrassons, de seguida as células foram incubadas durante mais 24 h nas mesmas condições. Após esta exposição, a monocamada celular foi lavada com PBS, para remoção dos excessos de nanomaterial. De seguida, foi tripsinizada e ressuspensa em meio de cultura novo,  $\alpha$ -MEM e DMEM suplementados, MC3T3-E1 e para Saos-2, respetivamente, para posterior análise por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a contagem, análise, separação e classificação das células individuais presentes num meio em suspensão. Assim, de forma rápida, obtemos uma análise multiparamétrica das características de milhares de células por segundo [Adan *et al.*, 2017]. Este método, é um método muito simples para avaliar o potencial de internalização de nanomateriais das células. Nesta técnica um feixe de luz de um só comprimento de onda é direcionado para o fluxo. Existe um detetor na horizontal para o parâmetro designado como *forward-scattered light* (FCS) e outro perpendicular designado *side-scattered light* (SSC). O parâmetro FCS indica o tamanho relativo da célula e a o parâmetro SSC, está relacionado com a complexidade interna da célula, que está definida pela quantidade e tipo dos organelos citoplasmáticos e vesículas (Adan *et al.*, 2017). Estes parâmetros foram medidos num citómetro de fluxo (Coulter XL Flow Cytometer Beckman Coulter, Hialeah, FL-USA), equipado comum laser de argon (15 mW, 488 nm). As aquisições foram obtidas usando o software SYSTEM II v. 3.0 (Beckman

Coulter, Hialeah, FL). Para cada amostra foram analisadas entre 5000–20000 células com um fluxo de 1000 células/s.

### **3.6. Espécies reativas de oxigênio**

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pelos pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2), estas células foram semeadas com uma densidade de 100.000 células/mL, numa placa de cultura de 24 poços e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas.

Após 24 h o meio de cultura foi substituído por meio de cultura novo, ao qual foram previamente adicionados os nanomateriais nas duas concentrações estudadas (10 e 50 µg/ml), previamente dispersados por ultrassons, de seguida, as células foram incubadas durante mais 24 h nas mesmas condições. Após esta exposição, a monocamada celular foi lavada com PBS, para remoção dos excessos de nanomaterial. De seguida, as células foram incubadas com a sonda DCFH-DA (10 µM), durante 30 min a 37°C. Este ensaio baseia-se na desacetilação da 2,7 dicloro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) em diclorofluorescina (DCFH), na presença de ROS intracelular [Halliwell *et al.*, 2004]. Após a incorporação da sonda, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura para análise por citometria de fluxo. (Halliwell *et al.*, 2004). Este parâmetro foi medido num citómetro de fluxo (Coulter XL Flow Cytometer Beckman Coulter, Hialeah, FL-USA), equipado com um laser de argon (15 mW, 488 nm). As aquisições foram obtidas usando o software SYSTEM II v. 3.0 (Beckman Coulter, Hialeah, FL). Para cada amostra foram analisadas entre 5000–20000 células com um fluxo de 1000 células/s.

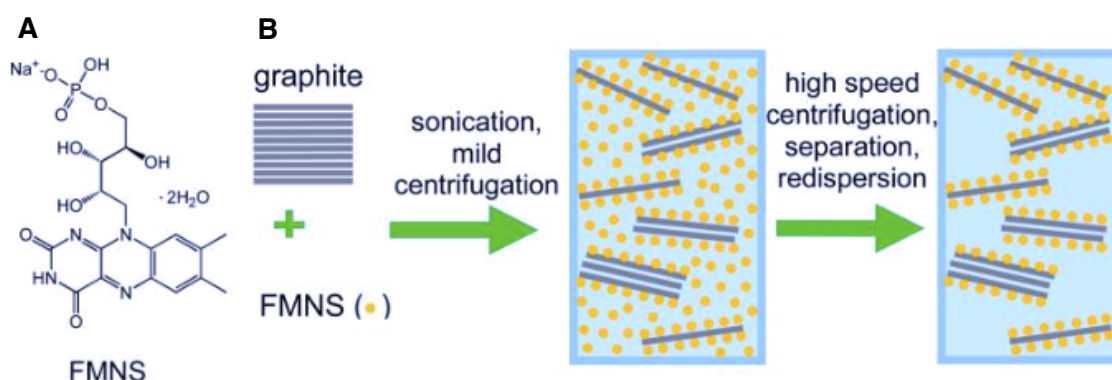
### **3.7. Análise estatística**

Os dados apresentados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão das experiências realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 19). As comparações estatísticas entre grupos foram feitas pela análise da variância (ANOVA), seguida do teste Scheffé. Foram consideradas diferenças estatísticas significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

O grafeno pristino, descrito como sendo um conjunto folhas de carbono simples sobrepostas, é um grafeno que não possui grupos funcionais na sua superfície, formando agregados em meio aquoso (Ayañ-Varela *et al.*, 2016; Dong and Qi, 2015). Para evitar a formação de agregados, vários autores referem que este nanomaterial precisa ser estabilizado com diferentes moléculas, como por exemplo, co-polímeros (polietilenoglicol (PEG; oxido de polietileno (PEO)) (Perumal *et al.*, 2017), polianilina (Zhang *et al.*, 2016), (hidroxilpropil)metil celulose (Majee *et al.*, 2017).

Neste trabalho as nano-folhas de grafeno pristino foram estabilizadas com mononucleótido de flavina (FMN). Esta molécula anfifílica consiste num anel orgânico heteronuclear tricíclico anexado (isoaloxazina dimetilada) com uma fração de álcool fosforilado (ribitol) (**Figura 6A**). Esse álcool fornece algumas características que são centrais para a sua utilização como um estabilizador eficiente das folhas de grafeno em meio aquoso. Devido ao seu carácter hidrofóbico e parcialmente aromático, a isoaloxazina da FMN, pode ser absorvido no plano basal do grafeno. O ribitol, apresenta um carácter hidrofílico que proporciona uma estabilidade coloidal, através de repulsões eletrostáticas existentes entre grupos fosfatos que estão negativamente carregados. Deste modo, a sobreposição das ligações  $\pi$  existentes nos anéis de isoaloxazina com as do grafeno, possibilitem uma interação entre os grupos fosfatos do ribitol, evitando a formação de agregados de grafeno pristino.



**Figura 6.** Estrutura química da FMN. (A) Esquema da preparação e purificação da dispersão do grafeno estabilizado com FMN (B) (Adaptado de Ayañ-Varela *et al.*, 2015).

Na **Figura 6B** representa a preparação, purificação e dispersão do grafeno pristino estabilizado com FMN. Após a solubilização da grafite e do FMN, foi necessário proceder a centrifugações sucessivas seguidas de ultrassons para conseguir separar a grafite em várias folhas de grafeno. Nesse procedimento ocorre a ligação entre o grafeno e o FMN por meio de repulsões eletrostáticas, existentes entre os grupos fosfatos. Por fim foi necessário proceder à eliminação do excesso de FMN presente no meio e para isso foram efetuadas centrifugações a alta velocidade, o que permitiu uma separação e re-dispersão do grafeno pristino estabilizado com FMN em meio aquoso (Ayañ-Varela *et al.*, 2015).

A amostras foram caracterizadas, por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e por microscopia de força atômica (AFM). Foi possível demonstrar que a suspensão de grafeno pristino consistiu em flocos com dimensões laterais de poucas centenas de nanómetros e cinco ou menos monocamadas grossas sobrepostas (Ayañ-Varela *et al.*, 2015). Para este trabalho as nano-folhas de grafeno pristino estabilizado com FMN apresentavam dimensões laterais entre 200-400 nm e 100-200 nm, designados doravante GP(L) e GP(S), respetivamente.

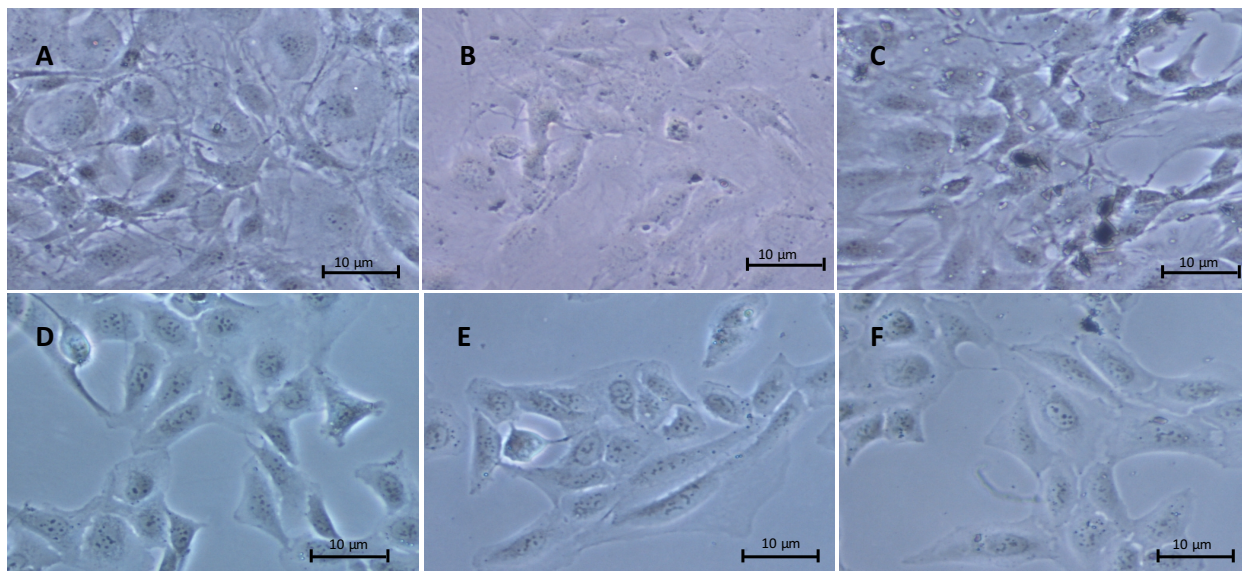
#### **4.1. Morfologia celular**

A avaliação morfológica dos pré-osteoblastos MC3T3-E1 e osteoblastos Saos-2 permitiu verificar, se a presença dos nanomateriais GP(L) e GP(S) (10 µg/mL) estava a alterar a formação da monocamada e a morfologia das células.

A **figura 7** mostra exemplos representativos da morfologia das células MC3T3-E1 e Saos-2 cultivadas na ausência de nanomaterial (Controlo) (**A** e **D**), respetivamente. **Figuras 7B** e **7C** representam as células MC3T3-E1 expostas a 10 µg/mL de GP(L) e GP(S), respetivamente. As **Figuras 7E** e **7F** mostram as células Saos-2 cultivadas na presença de GP(L) e GP(S) (10 µg/mL), respetivamente.

O estudo da morfologia celular por microscopia ótica invertida, realça a capacidade de ambas as linhas celulares (MC3T3-E1 e Saos-2), para formarem monocamada aderente (**Figura 7**). Os pré-osteoblastos MC3T3-E1 e os osteoblastos Saos-2 apresentam uma morfologia típica destas linhas celulares (**Figura 7A** e **7D**) quando cultivadas na ausência de nanomaterial (Controlo). Adicionalmente, as células expostas durante 24h, a 10 µg/mL de ambos os nanomateriais GP(L) e GP(S) apresentam uma morfologia celular semelhante

aos respectivos controlos. Portanto, podemos concluir que nestas condições experimentais os dois tamanhos de nano-folhas de grafeno prístino estabilizado com mononucleótido de flavina (FMN) não afetam a formação da monocamada e nem a morfologia das linhas celulares estudadas.



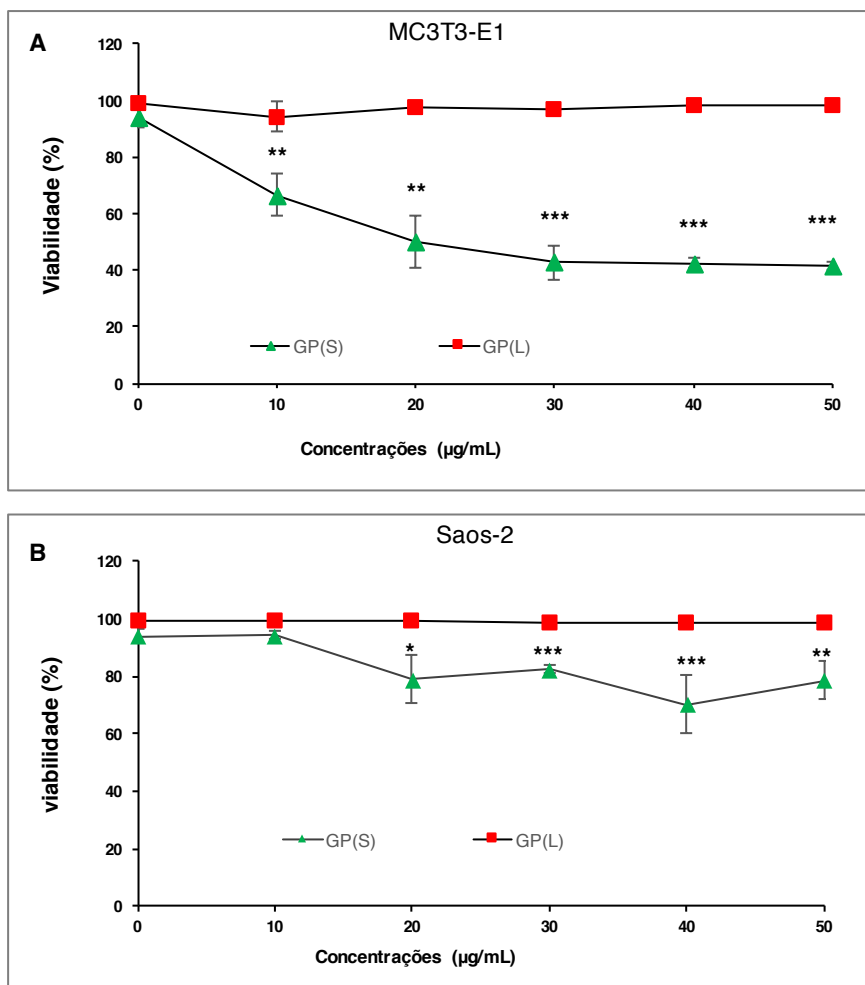
**Figura 7.** Morfologia celular de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (**A**, **B** e **C**) e osteoblastos Saos-2 (**D**, **E** e **F**) por microscopia ótica. As células MC3T3-E1 foram expostas durante 24 horas a 10 µg/mL de GP(L) (**B**) e GP(S) (**C**). As células Saos-2 foram expostas durante 24 horas a 10 µg/mL de GP(L) (**E**) e GP(S) (**F**). As imagens **A** e **D** representam as células MC3T3-E1 e Saos-2 cultivadas na ausência de nanomaterial (Controlo).

#### **4.2. Viabilidade e proliferação celular**

Para avaliar a citotoxicidade dos nanomateriais descritos, GP(L) e GP(S), foi avaliada a viabilidade e proliferação das duas linhas celulares escolhidas, MC3T3-E1 e Saos-2, para fazer um estudo comparativo entre uma linhagem não diferenciada e uma tumoral, respetivamente.

A **Figura 8** mostra a percentagem de viabilidade celular das células MC3T3-E1 expostas durante 24 h a diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) (10 - 50 µg/mL). Na **Figura 8A** os resultados mostram que este tipo celular quando exposto às diferentes concentrações de GP(L) mantém a sua viabilidade similar às células cultivadas na ausência de nanomaterial (controlo), sendo superior a 90%. Pelo contrário, quando estas células estão expostas a GP(S) nas diferentes concentrações estudadas, observamos uma diminuição significativa da viabilidade celular relativamente ao controlo. Esta diminuição é

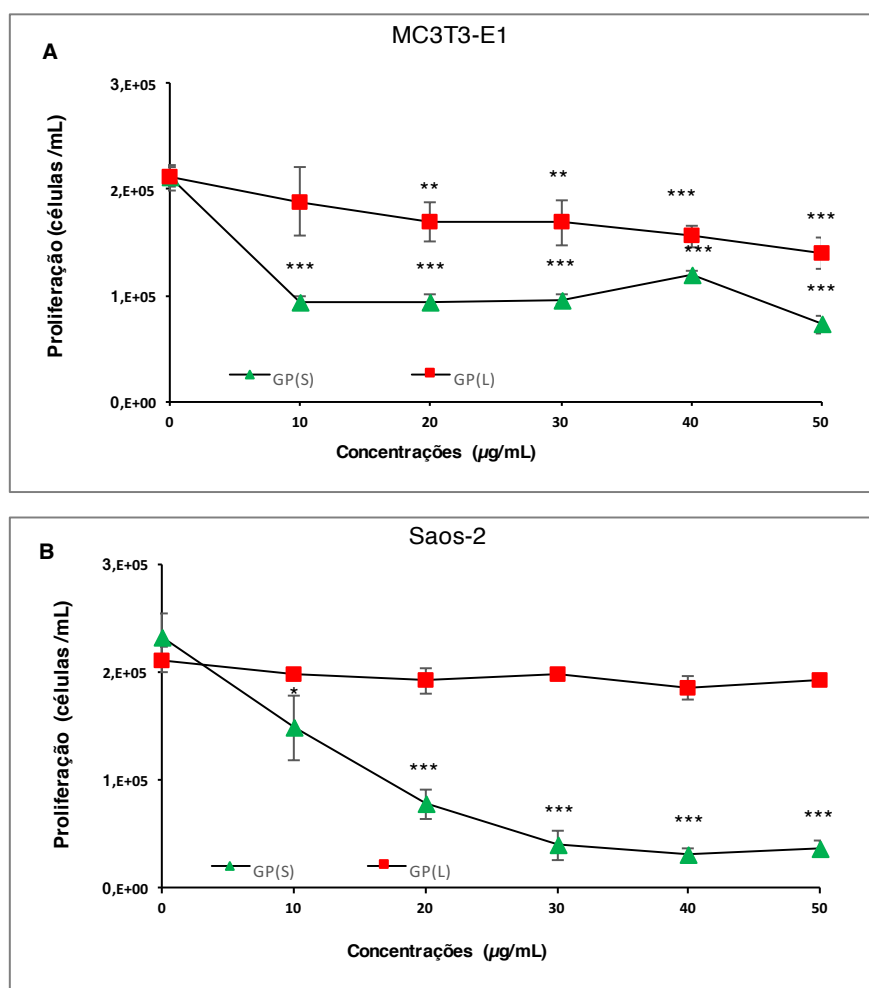
dependente da dose, sendo de 40% para a dose de 10  $\mu\text{g/ml}$  e sendo máxima (60%) a partir de 30  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 8.** Viabilidade celular das células MC3T3-E1 (**A**) e Saos-2 (**B**) expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ) GP(L) e GP(S), durante 24 h a 37°C, expressa em percentagem. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*), e  $p < 0,005$  (\*\*\*) representam as diferenças significativas em comparação com o valor do controlo.

A **Figura 8B** mostra a percentagem de viabilidade celular das células Saos-2 expostas durante 24 h a diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Tal como nas células MC3T3-E1, a percentagem de viabilidade das Saos-2 é similar ao respetivo controlo, sendo superior a 98% em todas as concentrações testadas de GP(L). Relativamente à exposição a GP(S), observamos uma diminuição significativa de 20% da viabilidade celular das Saos-2 relativamente ao controlo a partir da dose de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Neste caso a diminuição máxima observada foi de 30% quando este tipo celular foi exposto a 30  $\mu\text{g/mL}$  de GP(S).





**Figura 9.** Proliferação celular das células MC3T3-E1 (A) e Saos-2 (B) expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 - 50 µg/mL) GP(L) e GP(S), durante 24 h a 37°C, expressa em células/mL. Os valores estão expressos como médias ± desvio padrão. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, e \*\*\*p < 0,005 representam as diferenças significativas em comparação com o valor do controlo.

A capacidade proliferativa de células expostas a nanomateriais é um parâmetro biológico frequentemente avaliado para testar a sua citotoxicidade. A **Figura 9** mostra a proliferação celular (número de células viáveis/mL) das células MC3T3-E1 (A) e Saos-2 (B) expostas durante 24 h a diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) (10 - 50 µg/mL). Os resultados mostram que as células MC3T3-E1 (**Figura 9A**) quando expostas às diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) diminuem significativamente a sua proliferação em comparação com o respetivo controlo. De facto, observa-se uma diminuição gradual com o aumento da dose de GP(L) que varia entre 18% para a concentração de 20 µg/mL e 33% para a dose de 50 µg/mL. No caso da exposição destas células a GP(S) observa-se uma diminuição de 56% para a menor concentração estudada (10 µg/mL), sendo

máxima (66%) para a concentração de 50 µg/mL. Pelo contrário, a capacidade proliferativa das células Saos-2 não é afetada pela exposição às diferentes concentrações de GP(L) estudadas (10 - 50 µg/mL) (**Figura 9B**). Quando estas células são expostas a GP(S) nas diferentes concentrações estudadas, observamos uma diminuição significativa da proliferação celular relativamente ao controlo. Esta diminuição é dependente da dose, sendo de 37% para a dose de 10 µg/mL e sendo máxima (83%) a partir de 30 µg/mL.

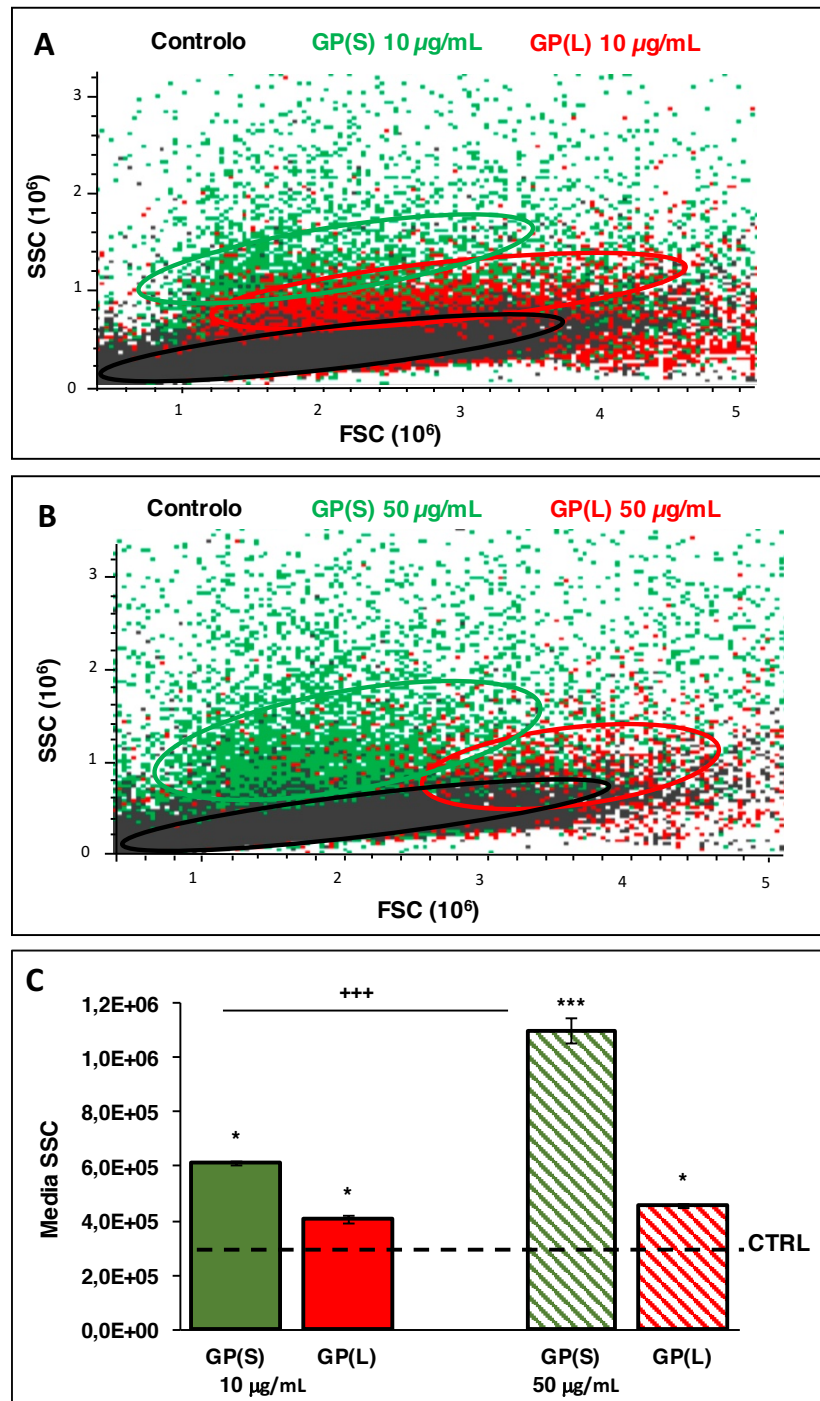
O estudo comparativo da viabilidade dos dois tipos celulares indica que ambos têm a mesma resposta em termos qualitativos, embora em termos quantitativos as células MC3T3-E1 parecem ser mais sensíveis à exposição a GP(S) do que as células Saos-2, uma vez que o efeito deste nanomaterial é mais acentuado (**Figura 8A e B**). Relativamente à proliferação celular (**Figura 9A e B**) a exposição a GP(L) afeta apenas a proliferação das células MC3T3-E1. Enquanto que a exposição a GP(S) tem um efeito inibitório da proliferação celular em ambas as linhagens celulares.

#### **4.3. Internalização celular**

Nos últimos anos a citometria de fluxo é usada como ferramenta para avaliar a incorporação de nanomateriais (Prina-Mello *et al.*, 2010). Neste trabalho esta técnica permitiu distinguir entre diferentes populações celulares com base no seu tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) (Kumar *et al.*, 2015).

A **Figura 10** mostra a internalização celular pelas células MC3T3-E1 expostas durante 24h a diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) (10 e 50 µg/mL). A **Figura 10A** mostra-nos um exemplo representativo da dispersão da complexidade celular interna (SSC) vs tamanho celular (FSC) de pré-osteoblastos (MC3T3-E1), de três populações celulares: expostas durante 24h a 10 µg/mL de nanomaterial GP(L) (vermelho) e GP(S) (verde), e a população de células controlo (preto). Os resultados mostram que temos um maior aumento da complexidade celular em presença do nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) relativamente ao controlo (preto) e ao nanomaterial de maior tamanho (GP(L)) (vermelho). Relativamente as células estão expostas a 10 µg/mL de GP(L) (vermelho), observa-se um aumento da complexidade interna (SSC) e do tamanho celular (FSC), em comparação com a população controlo (preto).

## MC3T3-E1



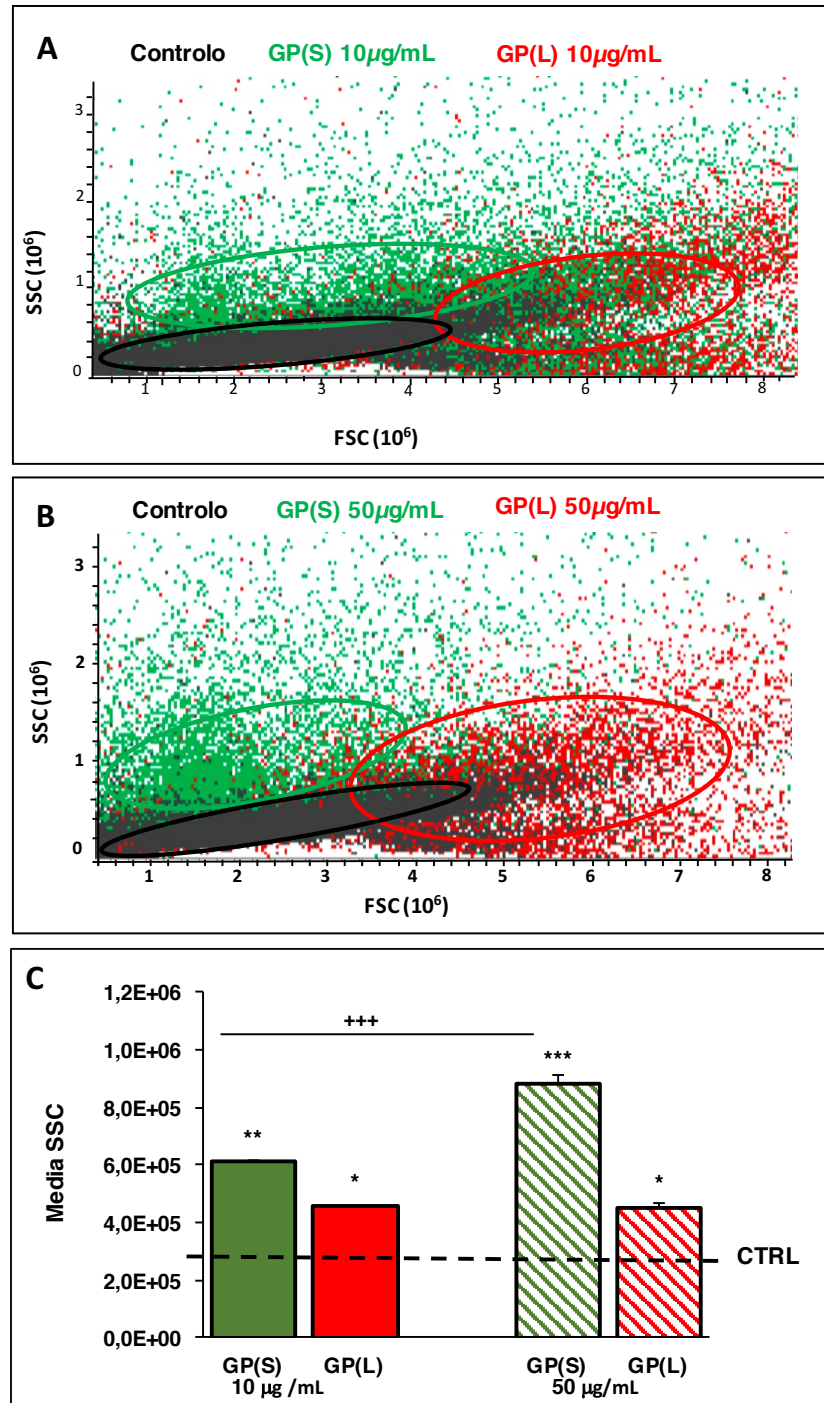
**Figura 10.** Internalização em células MC3T3-E1 expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 e 50 µg/mL) GP(L) e GP(S), durante 24 h a 37°C. Diagrama de dispersão comparando os parâmetros SSC vs FSC, dos diferentes nanomateriais GP(L) e GP(S) nas concentrações 10 µg/mL (**A**) e 50 µg/mL (**B**). Análise comparativa da complexidade interna de células MC3T3-E1(**C**) expressas como média  $\pm$  desvio padrão da complexidade celular. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, e \*\*\*p < 0,005 representam as diferenças significativas em comparação com o valor do controle. +++p < 0,005 representa as diferenças significativas do nanomaterial GP(S) nas concentrações de 10 e 50 µg/mL.

A **Figura 10B** mostra-nos a complexidade celular interna (SSC) vs tamanho celular (FSC) de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) expostas durante 24h a 50 µg/mL de nanomaterial GP(L) (vermelho) e GP(S) (verde) em comparação a população de células controlo (preto). Os resultados mostram que temos um aumento da complexidade celular na presença do nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) relativamente ao controlo (preto) e ao nanomaterial de maior tamanho (GP(L)) (vermelho). Relativamente às células expostas a 50 µg/mL de GP(L) (vermelho), observa-se um aumento da complexidade interna (SSC) e do tamanho celular (FSC), em comparação com a população controlo (preto).

A **Figura 10C** mostra o estudo comparativo da complexidade interna de células MC3T3-E1 expostas a duas concentrações (10 e 50 µg/mL) de nanomateriais GP(S) e GP(L). Os resultados demonstram que este parâmetro aumentou 2x e 3,9x para as concentrações de 10 e 50 µg/mL GP(S), respetivamente, em comparação com o controlo. Quando os pré-osteoblastos foram expostos ao nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) verificou-se que a sua complexidade interna é superior (1,7x) quando se aumenta a dose de 10 para 50 µg/mL. Da mesma forma, a complexidade interna dos pré-osteoblastos expostos a 10 e 50 µg/mL GP(L) também aumentou 44 e 62%, respetivamente, quando comparado com o controlo.

A **Figura 11** mostra a internalização celular de diferentes concentrações de GP(L) e GP(S) (10 e 50 µg/mL) pelas células Saos-2 expostas durante 24h. A **Figura 11A** mostra-nos um exemplo representativo da dispersão da complexidade celular interna (SSC) vs tamanho celular (FSC), de três populações celulares de osteoblastos (Saos-2): expostas durante 24h a 10 µg/mL de GP(L) (vermelho) e GP(S) (verde) e a população de células controlo (preto). Os resultados mostram que temos um aumento da complexidade celular interna na presença de 10 µg/mL do nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) relativamente ao controlo (preto) e ao nanomaterial de maior tamanho (GP(L)) (vermelho). Relativamente às células expostas a 10 µg/mL de GP(L) (vermelho), observa-se um aumento da complexidade interna (SSC) e do tamanho celular (FSC), em comparação com a população controlo (preto).

## Saos-2



**Figura 11.** Internalização em células Saos-2 expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 e 50 µg/mL) GP(L) e GP(S), durante 24 h a 37°C. Diagrama de dispersão comparando os parâmetros SSC vs FSC, dos diferentes nanomateriais GP(L) e GP(S) nas concentrações 10 µg/mL (A) e 50 µg/mL (B). Análise comparativa da complexidade interna de células Saos-2 (C) expressas como média ± desvio padrão da complexidade celular. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, e \*\*\*p < 0,005 representam as diferenças significativas em comparação com o valor do controle. +++p < 0,005 representa as diferenças significativas do nanomaterial GP(S) nas concentrações de 10 e 50 µg/mL.

A **Figura 11B** mostra-nos a complexidade celular interna (SSC) vs tamanho celular (FSC) de osteoblastos (Saos-2) expostas durante 24h a 50  $\mu\text{g/mL}$  de nanomaterial GP(L) (vermelho) e GP(S) (verde) em comparação a população de células controlo (preto). Os resultados mostram que temos um aumento da complexidade celular na presença do nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) relativamente ao controlo (preto) e ao nanomaterial de maior tamanho (GP(L)) (vermelho). Relativamente às células expostas a 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) (vermelho), observa-se um aumento da complexidade interna (SSC) e do tamanho celular (FSC), em comparação com a população controlo (preto).

O estudo comparativo da complexidade interna de células Saos-2 expostas a duas concentrações (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) de nanomateriais GP(S) e GP(L) está representado na **Figura 11C**. Os resultados demonstram que este parâmetro aumentou 2,2x e 3,2x para as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(S), respetivamente, em comparação com o controlo. Além disso, quando os pré-osteoblastos foram expostos ao nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) os resultados demonstram que este parâmetro (SSC) é ligeiramente superior quando se aumenta a dose de 10 para 50  $\mu\text{g/mL}$ . Por outro lado, a complexidade interna dos pré-osteoblastos expostos a duas concentrações (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) de GP(L) aumentou 68 e 67%, respetivamente, quando comparado com o controlo.

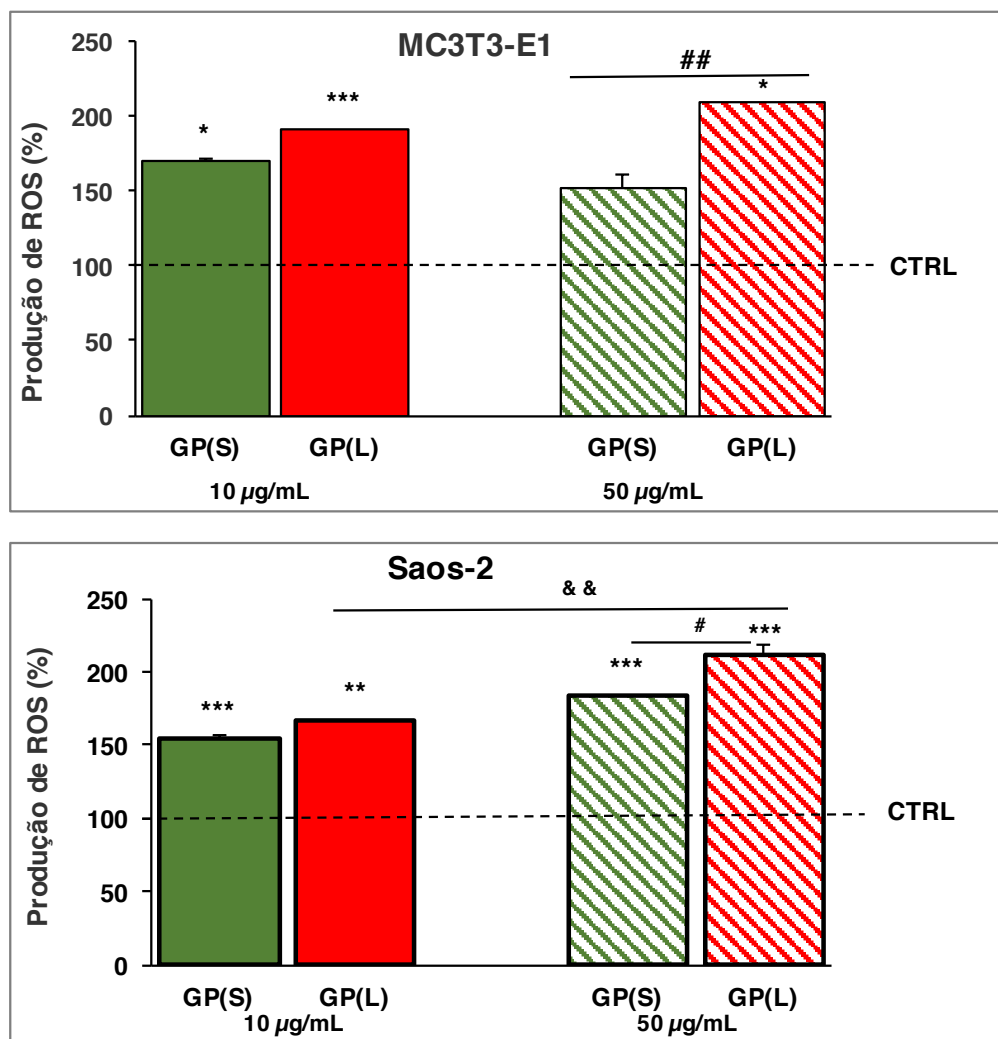
A incorporação de GP(S) nas diferentes concentrações estudadas induziu um aumento da complexidade pré-osteoblástica e osteoblástica sem alterações no tamanho celular. Por outro lado, a internalização de GP(L) em Saos-2 nas duas concentrações estudadas induziu um aumento no tamanho celular e também na sua complexidade celular.

#### ***4.4. Espécies reativas de oxigénio***

Neste trabalho foi estudado o stress oxidativo induzido pelos nanomateriais GP(L) e GP(S) nos pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2), através da avaliação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS).

A **Figura 12** mostra a produção de ROS das células MC3T3-E1 (**A**) Saos-2 (**B**) expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) GP(L) e GP(S), durante 24h a 37°C, expressas em percentagem. A **figura 12A** mostra que temos um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigénio pelas células MC3T3-E1 quando expostas a 10  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) e GP(S) de 70% e 91%, respetivamente, relativamente ao controlo. Quando estas células foram expostas a 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) e

GP(S) observa-se um aumento significativo de 1,5 e 2x, respetivamente, comparando a condição controlo. Apenas no caso da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) e GP(S) é observado um aumento significativo de 58% na produção de espécies reativas de oxigénio dependente do aumento do tamanho do nanomaterial (de menor tamanho para o nanomaterial de maior tamanho).



**Figura 12.** Produção de ROS das células MC3T3-E1 (A) Saos-2 (B) expostas a diferentes concentrações de nanomateriais (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) GP(L) e GP(S), durante 24 h a 37°C, expressas em percentagem. Os valores estão expressos com médias  $\pm$  desvio padrão. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, e \*\*\*p < 0,005 representam as diferenças significativas em comparação com o valor do controlo. ##p < 0,01, representa as diferenças significativas de nanomateriais GP(L) em diferentes concentrações (10  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ ). &p < 0,05, representa as diferenças significativas entre os nanomateriais GP(L) e GP(S) numa concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

A **figura 12B** apresenta a percentagem de produção de espécies reativas de oxigénio das células Saos-2 expostas durante 24h a 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) e GP(S). Os resultados demonstram que este tipo celular, quando exposto às concentrações de GP(L) têm um aumento significativo de 1,7 e 2x para 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente, com respeito ao controlo. Quando estas células estão expostas a GP(S) as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , observa-se um aumento significativo de ROS de 55% e 83%, respetivamente quando comparado ao controlo. No caso do nanomaterial de maior tamanho (GP(L)) é observado um aumento significativo de 40% na produção de espécies reativas de oxigénio dependente do aumento da dose (de 10 para 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Podemos também observar um aumento de 28% quando as células estão expostas a uma concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  de GP(L) e GP(S), sendo esse aumento dependente do tamanho do nanomaterial (do nanomaterial de menor tamanho para o nanomaterial de maior tamanho).

A produção de ROS pelos pré-osteoblastos MC3T3-E1 e osteoblastos Saos-2 aumenta quando expostos a dois tamanhos diferentes (GP(L) e GP(S)) de grafeno pristino estabilizado com FMN e a duas concentrações (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com as células controlo. Da mesma forma, se pode confirmar que os pré-osteoblastos MC3T3-E1 e os osteoblastos expostos a maior dose testada (50  $\mu\text{g/mL}$ ) aumentam a sua produção de ROS quando são cultivadas com o grafeno pristino de maior tamanho (GP(L)) comparando com o de menor tamanho (GP(S)).



## 5. Discussão

Recentemente, os nanomateriais baseados em carbono têm sido propostos nas mais variadas áreas, como por exemplo na área da nanomedicina (Sahoo *et al.*, 2007). Este campo da medicina esta em constante expansão com um foco especial nas terapias anti-tumorais, incluindo os sistemas de transporte de drogas/genes, terapia fototérmica, entre outras (Sahoo *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2011; Venugopal and Ramakrishna, 2016). Para esta aplicação ser possível e necessário a síntese de nanomateriais com características físico-químicas específicas, nomeadamente; tamanho (dimensão lateral), funcionalização, carga, grau de oxigenação, forma, composição, numero de camadas, uma vez que estas propriedades influenciam as respostas celulares (Zarbin, 2007; Baril *et al.*, 2012; Gómez-Gallego *et al.*, 2016).

Com este trabalho avaliou-se a citotoxicidade do grafeno pristino estabilizado com mononucleótido de flavina (FMN), com duas dimensões laterais entre 200-400nm (GP(L)) e 100-200nm (GP(S)), avaliando o impacto destes nanomateriais na morfologia celular, viabilidade e proliferação celular, internalização celular, e produção de espécies reativas de oxigénio de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2).

Relativamente ao estudo comparativo da viabilidade dos dois tipos celulares, os pré-osteoblastos (MC3T3-E1) parecem ser mais sensíveis à exposição do nanomaterial de menor tamanho (GP(S)) do que os osteoblastos (Saos-2), uma vez que foi observado uma diminuição deste parâmetro (Figura 8). Em relação a proliferação celular a exposição a GP(S) foi novamente a que teve maior impacto uma vez que apresentou um efeito inibitório em ambas as linhas celulares, enquanto que a exposição ao grafeno pristino de maior tamanho (GP(L)) só afetou a proliferação das células MC3T3-E1 (Figura 9). Estas diferenças nas respostas celulares poderão ser devidas às características intrínsecas de cada uma das linhas celulares, nomeadamente pelo facto, de a linha MC3T3-E1 ser constituída por células pré-osteoblásticas não diferenciadas e a Saos-2 por células tumorais (Rodan *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1999; Quing *et al.*, 2017; Strzelecka-Kilisek *et al.*, 2017). Os resultados apresentados neste trabalho estão em concordância com os resultados publicados por vários autores. Majeed e seus colaboradores demonstraram que grafeno pristino a diferentes concentrações (5, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) originou uma diminuição de viabilidade de células neuronais (PC12) dependente da dose. Também, Conroy *et al.*, mostraram que o grafeno pristino causou uma diminuição de viabilidade de células pulmonares e hepatócitos (A549 e HepG2). Chatterjee e seus colaboradores,

demonstraram que grafeno pristino funcionalizado com COOH e NH<sub>2</sub>, causou uma diminuição da viabilidade de células do epitélio brônquico dependente da dose, e da funcionalização. Por fim, Sasidharan et al., mostraram que grafeno pristino a diferentes concentrações (0-300 µg/mL), também induziu uma diminuição da viabilidade celular de células renais (Vero) dependente da dose. Portanto, relativamente ao nosso estudo podemos concluir que as diminuições da viabilidade e proliferação de pré-osteoblastos e osteoblastos são dependentes do tamanho do nanomaterial, com a menor dimensão lateral do grafeno pristino, menor é a viabilidade e a proliferação celular. Da mesma forma, a diminuição da viabilidade e proliferação celular é dependente do aumento da dose a que as células foram expostas (10-50 µg/mL).

Para que os nanomateriais baseados em carbono possam ser utilizados nas aplicações já mencionadas, é necessário que o nanomaterial seja incorporado pelas células sem causar qualquer alteração estrutural e funcional. Para avaliar esta incorporação a citometria de fluxo e uma técnica simples, amplamente utilizada (Suzuki, 2007; Welsh et al., 2017). Neste trabalho, a internalização de grafeno pristino estabilizado com FMN pelas células MC3T3-E1 e Saos-2 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando a luz de dispersão lateral (side-scatter) (SSC). Os resultados apresentados demonstram que o grafeno pristino funcionalizado com FMN (100-200 nm e 200-400 nm) é internalizado pelos dois tipos celulares estudados. Além disso, este parâmetro não é dependente do tipo celular, uma vez que tanto pré-osteoblastos como osteoblastos exibem o mesmo comportamento, mas é dependente do tamanho do nanomaterial. De facto, a incorporação do nanomaterial de menor tamanho GP(S), (100-200 nm) pelos dois tipos celulares é superior ao observado quando as células foram expostas ao grafeno pristino de maior tamanho (200-400 nm). Por outro lado, só no caso do grafeno de menor tamanho é que se observa um aumento da incorporação dependente da dose (10 para 50 µg/mL). Linares e colaboradores demonstraram que células osteoblásticas e pré-osteoblásticas expostas durante 24h a 75 µg/mL de óxido de grafeno funcionalizado com polietilenoglicol (PEG) tinham uma incorporação dependente do tipo celular. Assim, concluíram que as linhas de células osteoblásticas (Saos-2) incorporaram mais GO-PEG do que as pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) (Linares et al., 2014). Embora neste estudo tenham sido usadas as mesmas linhas celulares, os resultados são díspares uma vez que utilizaram um nanomaterial baseado em carbono, com um grau de oxigenação diferente do grafeno pristino, além de uma distinta funcionalização.

Tem sido descrito por vários autores que a incorporação de nanomateriais baseados em carbono por diferentes linhas celulares pode provocar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Chang *et al.*, 2011; Sasidharan *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Sasidharan *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Lammel *et al.*, 2013; Matesanz *et al.*, 2013; Conroy *et al.*, 2014). Esse aumento é descrito como sendo devido à incapacidade das enzimas antioxidantes eliminarem os intermediários reativos, levando a um aumento do stress oxidativo (desequilíbrio entre as espécies oxidantes e redutoras no meio intracelular) (Sasidharan *et al.*, 2011). O stress oxidativo é considerado uma das principais causas de citotoxicidade de um nanomaterial depois da sua internalização na célula (Sasidharan *et al.*, 2011; Tyagi *et al.*, 2017). Neste trabalho a exposição a grafeno pristino estabilizado com FMN (100-200 nm e 200-400 nm), GP(S) e GP(L) respetivamente, nas duas concentrações estudadas (10 e 50 µg/mL) induziu um aumento na produção de ROS, nas células pré-osteoblásticas e osteoblásticas. Curiosamente, sendo o grafeno pristino estabilizado com FMN de menor tamanho (100-200 nm) o mais internalizado pelos dois tipos celulares, é o de maior tamanho (200-400 nm) aquele que induz a produção de maior quantidade de ROS. Os resultados deste trabalho, estão de acordo com os obtidos por Sasidharan e seus colaboradores, que demonstram um aumento na produção de ROS quando as células estão expostas a grafeno pristino. Os resultados também são corroborados por outros autores que apresentaram um aumento na produção de ROS em várias linhas celulares (macrófagos, fibroblastos, e células do fígado, pulmonares e renais) sendo esse aumento dependente da dose e da sua funcionalização. (Sasidharan *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Sasidharan *et al.*, 2012; Conroy *et al.*, 2014). Relativamente ao nosso estudo podemos concluir que os aumentos na produção de ROS de pré-osteoblastos e osteoblastos são dependentes do tamanho do nanomaterial, com a maior dimensão lateral do grafeno pristino, maior é a produção de ROS. Da mesma forma, o aumento da produção de ROS é dependente do aumento da dose a que as células foram expostas (10-50 µg/mL).



## 6. Conclusões

Neste trabalho foi possível avaliar a citotoxicidade do grafeno pristino estabilizado com mononucleótido de flavina (FMN) de dois tamanhos (100-200 nm e 200-400 nm) em duas linhas celulares, pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e osteoblastos (Saos-2), avaliando o impacto destes nanomateriais na sua morfologia celular, viabilidade e proliferação celular, internalização celular e produção de espécies reativas de oxigênio.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as células pré-osteoblásticas e osteoblásticas, MC3T3 e Saos-2, respetivamente, na presença de diferentes concentrações de grafeno pristino de menor tamanho (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ), durante 24h, apresentaram uma diminuição da sua viabilidade e uma inibição da sua taxa de proliferação, de uma forma dependente da concentração, em comparação com as células cultivadas na ausência de nanomaterial. Pelo contrário, quando estas células foram expostas a grafeno pristino de maior tamanho (10 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ), demonstraram uma viabilidade similar às células controlo. Relativamente à proliferação celular, as células osteoblásticas não foram afetadas, enquanto que as pré-osteoblásticas diminuí com o aumento da concentração de nanomaterial. Através da citometria de fluxo, foi possível comprovar a internalização de nanomaterial e a produção de espécies reativas de oxigênio pelos dois tipos celulares estudados (MC3T3-E1 e Saos-2), após 24h de cultura na presença de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de nanomateriais. A internalização celular de grafeno pristino de menor tamanho por ambos os tipos celulares é dependente da dose, sendo maior para a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . A exposição durante 24h a estes nanomateriais induziu produção de ROS em ambas as linhas celulares. Além disso, sendo o grafeno pristino estabilizado com FMN de menor tamanho (100-200 nm) o mais internalizado pelos dois tipos celulares, é o de maior tamanho (200-400 nm) aquele que induz a produção de maior quantidade de ROS.

Conseguimos concluir com este trabalho que o grafeno pristino estabilizado com um mononucleótido de flavina (FMN), independentemente do tamanho, é citotóxico para os pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e os osteoblastos (Saos-2).



## 7. Bibliografia

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176.
- Ahmadi, M., Elmongy, H., Madrakian, T., Abdel-Rehim, M. (2017). Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. *Analytica Chimica Acta*, 958, 1–21.
- Amedea, B. S., Amauri, J. P., De Lima, R., Alves, O. L., Durán, N. (2014). Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chemical Research in Toxicology*, 27(2), 159–168.
- Avouris, P., and Dimitrakopoulos, C. (2012). Graphene: Synthesis and applications. *Materials Today*, 15(3), 86–97.
- Ayán-Varela, M., Paredes, J. I., Guardia, L., Villar-Rodil, S., Munuera, J. M., Díaz-González, M., Tascón, J. M. D. (2015). Achieving extremely concentrated aqueous dispersions of graphene flakes and catalytically efficient graphene-metal nanoparticle hybrids with flavin mononucleotide as a high-performance stabilizer. *ACS Applied Materials and Interfaces*.
- Ayán-Varela, M., Ruiz-Rosas, R., Villar-Rodil, S., Paredes, J. I., Cazorla-Amorós, D., Morallón, E., Tascón, J. M. D. (2017). Efficient Pt electrocatalysts supported onto flavin mononucleotide–exfoliated pristine graphene for the methanol oxidation reaction. *Electrochimica Acta*, 231(16), 386–395.
- Bagheri, A., Moreno, J., Semplici, S. (2015). *Global Bioethics: The Impact of UNESCO International Bioethics Committee*.
- Baril, M., Frango, G., Viana, R., Zanin, S. M. (2012). Nanotecnologia aplicada aos cosméticos nanotechnology applied to cosmetics. *Visão Acadêmica, Curitiba*, 13(1), 45–54.
- Bianco, A., Cheng, H. M., Enoki, T., Gogotsi, Y., Hurt, R. H., Koratkar, N., Zhang, J. (2013). All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon*, 65, 1–6.
- Bleeker, E. A. J., de Jong, W. H., Geertsma, R. E., Groenewold, M., Heugens, E. H. W., Koers-Jacquemijns, M., Oomen, A. G. (2013). Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Regulatory Toxicology and*

- Pharmacology*, 65(1), 119–125.
- Brodie, B. (1859). On the atomic weight of graphite. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, XIII, 249–259.
- Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R. (2013). Carbon-Based Nanomaterials : Multifunctional Materials for Engineering, Biomedical. *American Chemical Society*.
- Chakraborty, M., Jain, S., Rani, V. (2011). Nanotechnology: Emerging tool for diagnostics and therapeutics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(5–6), 1178–1187.
- Chang, Y., Yang, S.-T., Liu, J.-H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Wang, H. (2011). In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology Letters*, 200(3), 201–210.
- Chatterjee, N., Yang, J. S., Park, K., Oh, S. M., Park, J., Choi, J. (2015). Screening of toxic potential of graphene family nanomaterials using in vitro and alternative in vivo toxicity testing systems. *Environmental Health and Toxicology*, 30, e2015007.
- Ciszewski, M., Mianowski, A. (2014). Capacitive behavior of highly-oxidized graphite. *Materials Science-Poland*, 32(3), 307–314.
- Conroy, J., Verma, N. K., Smith, R. J., Rezvani, E., Duesberg, G. S., Coleman, J. N., Volkov, Y. (2014). Biocompatibility of Pristine Graphene Monolayers, Nanosheets and Thin Films, (1), 2–3.
- Cordeiro, G. L., Oliveira, R. R., Ferreira, N. A. M., Xavier, G. L., Yoshito, W. K., Lima, N. B., Ussui, V. (2015). Síntese química e caracterização de grafeno, 2323–2332.
- Daima, H. K., and Bansal, V. (2015). *Influence of Physicochemical Properties of Nanomaterials on Their Antibacterial Applications. Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*. Elsevier Inc.
- Das, S., Singh, S., Singh, V., Joung, D., Dowding, J. M., Reid, D., Seal, S. (2013). Oxygenated functional group density on graphene oxide: Its effect on cell toxicity. *Particle and Particle Systems Characterization*, 30(2), 148–157.
- Disner, G., & MM, C. (2016). Nanociencia & Nanotecnologia. *Evidencia Joaçaba*, 16(1), 71–76.
- Dolez, P. I. (2015). *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues. Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*.
- Dong, H. S., and Qi, S. J. (2015). Realising the potential of graphene-based materials for



- biosurfaces – A future perspective. *Biosurface and Biotribology*, 1(4), 229–248.
- Dreyer, R. D., Park, S., Bielawski, C., Ruoff, R. . (2010). The chemistry of graphene oxide. *The Royal Society of Chemistry*, 39, 228–240.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1–24.
- Edwards, R. S., and Coleman, K. S. (2013). Graphene synthesis: relationship to applications. *Nanoscale*, 5(1), 38–51.
- Erol, O., Uyan, I., Hatip, M., Yilmaz, C., Tekinay, A. B., Guler, M. O. (2016). Recent advances in bioactive 1D and 2D carbon nanomaterials for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*.
- Gómez-Gallego, D. M., Urcuqui-Inchima, S., y Hernández, J. C. (2016). Efecto inmunomodulador de nanopartículas usadas en nanomedicina. *Revista Iatreia*, 29(4), 445–457.
- Gupta, A., Sakthivel, T., Seal, S. (2015). Recent development in 2D materials beyond graphene. *Progress in Materials Science*, 73, 44–126.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255.
- Hirsch, A. (2010). The era of carbon allotropes. *Nature Materials*, 9(11), 868–871.
- Horváth, L., Magrez, A., Burghard, M., Kern, K., Forró, L., Schwaller, B. (2013). Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface. *Carbon*, 64, 45–60.
- Hummers, W., and Offeman, R. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), 1339.
- Karn, B., Kuiken, T., Otto, M. (2009). Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks. *Environmental Health Perspectives*, 117(12), 1823–1831.
- Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Chaudhry, Q. (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today*, 5(3), 165–168.

- Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B. J., Goering, P. L. (2015). Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 45–51.
- Lammel, T., Boisseaux, P., Fernández-Cruz, M.-L., Navas, J. M. (2013). Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 27.
- Lee, J. H., Shin, Y. C., Jin, O. S., Lee, E. J., Han, D.-W., Kang, S. H., Kim, S. H. (2012). Cytotoxicity evaluations of pristine graphene and carbon nanotubes in fibroblastic cells. *Journal of the Korean Physical Society*, 61(6), 873–877.
- Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 33(2), 402–411.
- Linares, J., Matesanz, M. C., Vila, M., Feito, M. J., Gonçalves, G., Vallet-Regí, M., Portolés, M. T. (2014). Endocytic mechanisms of graphene oxide nanosheets in osteoblasts, hepatocytes and macrophages. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(16), 13697–13706.
- Loos, M. (2015). Allotropes of Carbon and Carbon Nanotubes. *Carbon Nanotube Reinforced Composites*, 73–101.
- Louro, H., Borges, T., Silva, M. J. (2013). Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, 31(2), 145–157.
- Lu, M. C., Yu, C. L., Yu, H. C., Huang, H. Bin, Koo, M., Lai, N. S. (2016). Anti-citrullinated protein antibodies promote apoptosis of mature human Saos-2 osteoblasts via cell-surface binding to citrullinated heat shock protein 60. *Immunobiology*, 221(1), 76–83.
- Lv, M., Zhang, Y., Liang, L., Wei, M., Hu, W., Li, X., Huang, Q. (2012). Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line. *Nanoscale*, 4(13), 3861.
- Majee, S., Liu, C., Wu, B., Zhang, S. L., & Zhang, Z. B. (2017). Ink-jet printed highly conductive pristine graphene patterns achieved with water-based ink and aqueous doping processing. *Carbon*, 114, 77–83.
- Mao, S. S., and Chen, X. (2007). Selected nanotechnologies for renewable energy

- applications. *International Journal of Energy Research*, 31(6–7), 619–636.
- Marques, E. F. (2014). Da nanociência à nanotecnologia, *Visão Acadêmica*, 2(203).
- Matesanz, M. C., Vila, M., Feito, M. J., Linares, J., Gonçalves, G., Vallet-Regi, M., Portolés, M. T. (2013). The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. *Biomaterials*, 34(5), 1562–1569.
- Mattevi, C., Colléaux, F., Kim, H., Lin, Y.-H., Park, K. T., Chhowalla, M., Anthopoulos, T. D. (2012). Solution-processable organic dielectrics for graphene electronics. *Nanotechnology*, 23(34), 344017.
- McCallion, C., Burthem, J., Rees-Unwin, K., Golovanov, A., Pluen, A. (2016). Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 104, 235–250.
- Meng, H., Liong, M., Xia, T., Li, Z., Ji, Z., Zink, J. I., Nel, A. E. (2010). Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and Pgp siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS Nano*, 4(8), 4539.
- Motao Zhu, G. N. (2012). Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Accounts of Chemical Research*, 46(3).
- Nanda, S. S., Papaefthymiou, G. C., Yi, D. K. (2015). Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 40(5), 291–315.
- Nikam A.P., Mukesh P., R., Chaudhari. S. P. (2014). Nanoparticles – an overview. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci.*, 3(5), 1121–1127.
- Novoselov, K. S., Falko, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., Kim, K. (2012). A roadmap for graphene. *Nature*, 490(7419), 192–200.
- Oliveira, S. F., Bisker, G., Bakh, N. A., Gibbs, S. L., Landry, M. P., Strano, M. S. (2015). Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications. *Carbon*, 95, 767–779.
- Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Shao, L. (2016). Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 57.
- Panneerselvam, S., Choi, S. (2014). Nanoinformatics: Emerging databases and available

- tools. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7158–7182.
- Pasqualim, P., Culpi, T., Kaminski, G. A., Fin, M., Sasso, D. G., Costa, C., Zanin, S. M. (2010). Microcápsulas De Alginato De Cálcio E Óleo Vegetal Pela Técnica De Gelificação Iônica : Um Estudo Da Capacidade De Encapsulamento E Aplicação Dermatológica Microcapsules of Calcium Alginate and Vegetable Oil By Ionic Gelation : a Study of Encapsulation Ca. *Visão Acadêmica, Curitiba*, 11(1), 23–37.
- Paula, G., and Marcone, D. S. (2015). Nanotecnologia E Nanociência : Aspectos Gerais , Aplicações E Perspectivas No Contexto Do Brasil, 1–24.
- Perumal, S., Lee, H. M., Cheong, I. W. (2017). High-concentration graphene dispersion stabilized by block copolymers in ethanol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 497, 359–367.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., Bevilacqua, A. (2017). Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological Procedures Online*, 19(1), 8.
- Prina-Mello, A., Whelan, A. M., Atzberger, A., McCarthy, J. E., Byrne, F., Davies, G. L., Gun'Ko, Y. K. (2010). Comparative flow cytometric analysis of immunofunctionalized nanowire and nanoparticle signatures. *Small*, 6(2), 247–255.
- Qing, T., Mahmood, M., Zheng, Y., Biris, A. S., Shi, L., & Casciano, D. A. (2017). A genomic characterization of the influence of silver nanoparticles on bone differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of Applied Toxicology*, 1–8.
- Rai, M., and Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to pest control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 287–293.
- Randviir, E. P., Brownson, D. A. C., Banks, C. E. (2014). A decade of graphene research: Production, applications and outlook. *Materials Today*, 17(9), 426–432.
- Rauscher, H., Sokull-Klüttgen, B., Stamm, H. (2013). The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology*, 7(7), 1195–7.
- Rodan, S., Imai, Y., Thiede, M., Wesolowski, G. (1987). Characterization of a human osteosarcoma cell line {{Saos-2}} with osteoblastic properties, 4961–4966.
- Rodríguez-Pérez, L., Herranz, M. Á., & Martín, N. (2013). The chemistry of pristine

- graphene. *Chemical Communications*, 49(36), 3721.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 20–31.
- Sanchez, F., and Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials*, 24(11), 2060–2071.
- Sanchez, V. C., Jachak, a, Hurt, R. H., Kane, a B. (2012). Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials—An Interdisciplinary Review. *Chemical Research in Toxicology*, 15–34.
- Sasidharan, A., Panchakarla, L. S., Chandran, P., Menon, D., Nair, S., Rao, C. N. R., Koyakutty, M. (2011). Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. *Nanoscale*, 3(6), 2461.
- Sasidharan, A., Panchakarla, L. S., Sadanandan, A. R., Ashokan, A., Chandran, P., Girish, C. M., Koyakutty, M. (2012). Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small*, 8(8), 1251–1263.
- Schweizer, D. K., and Eigler, E. K. (1990). Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. *Nature*.
- Shima, H. (2012). *Buckling of carbon nanotubes: A state of the art review*. *Materials* (Vol. 5).
- Strzelecka-Kiliszek, A., Bozycki, L., Mebarek, S., Buchet, R., Pikula, S. (2017). Characteristics of minerals in vesicles produced by human osteoblasts hFOB 1.19 and osteosarcoma Saos-2 cells stimulated for mineralization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 171, 100–107.
- Suzuki, H., Toyooka, T., Ibuki, Y. (2007). Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environmental Science and Technology*, 41(8), 3018–3024.
- Tarafdar, J. C., Sharma, S., & Raliya, R. (2013). Nanotechnology : Interdisciplinary science of applications, *African Journal of Biotechnology* 12(3), 219–226.
- Teo, W. Z., Sofer, Z., Šembera, F., Janoušek, Z., Pumera, M. (2015). Cytotoxicity of fluorographene. *RSC Advances*, 5(129), 107158–107165.

- Tonelli, F. M. P., Lacerda, S. M. S. N., Paiva, N. C. O., Lemos, M. S., de Jesus, A. C., Pacheco, F. G., Resende, R. R. (2016). Efficient and safe gene transfection in fish spermatogonial stem cells using nanomaterials. *RSC Adv.*, 6(58), 52636–52641.
- Tyagi, N., Attia, N. F., Geckeler, K. E. (2017). Exfoliated graphene nanosheets: pH-sensitive drug carrier and anti-cancer activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498, 364–377.
- Venugopal, J. R., and Ramakrishna, S. (2016). Nanotechnology: 21st century revolution in restorative healthcare. *Nanomedicine*, nnm.16.46.
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., Franceschi, R. T. (1999). Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(6), 893–903.
- Welsh, J. A., Holloway, J. A., Wilkinson, J. S., Englyst, N. A. (2017). Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 1–7.
- Yang, K., Feng, L., Liu, Z. (2015). The advancing uses of nano-graphene in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(4), 601–612.
- Yuan, J., Gao, H., Sui, J., Duan, H., Chen, W. N., Ching, C. B. (2012). Cytotoxicity evaluation of oxidized single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on human hepatoma HepG2 cells: An iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis. *Toxicological Sciences*, 126(1), 149–161.
- Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Su, Z. (2012). The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials*, 33(16), 4013–4021.
- Zarbin, A. J. G. (2007). QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. *Quim. Nova*, 30(6), 1469–1479.
- Zarbin, A. J. G., & Oliveira, M. M. (2013). Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo vadis? *Quimica Nova*, 36(10), 1533–1539.
- Zhai, W., Srikanth, N., Kong, L. B., Zhou, K. (2017). Carbon nanomaterials in tribology. *Carbon*, 119, 150–171.
- Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D., Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity

effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived pc12 cells. *ACS Nano*, 4(6), 3181–3186.

Zhang, Y., Si, L., Zhou, B., Zhao, B., Zhu, Y., Zhu, L., Jiang, X. (2016). Synthesis of novel graphene oxide/pristine graphene/polyaniline ternary composites and application to supercapacitor. *Chemical Engineering Journal*, 288, 689–700.